

# **Steroidprofil**

## **etablering av en kvantitativ metode for endogene steroider**

**Hovedfagsoppgave for graden *Candidata pharmaciae***



**Ingvild Liborg**

**Avdeling for farmasøytisk kjemi,  
Farmasøytisk institutt,  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,  
Universitetet i Oslo**

**Oktober 2007**



Hovedfagsoppgave i legemiddelkjemi

Fagområde: Legemiddelanalyse

Steroidprofil

etablering av en kvantitativ metode for endogene steroider

Ingvild Liborg

Veiledere:

Prof. Dr. Peter Hemmersbach

Farmasøytisk institutt/Seksjon for dopinganalyse

Hormonlaboratoriet, Aker Universitetssykehus

Siv.Ing. John Henninge

Seksjon for dopinganalyse

Hormonlaboratoriet, Aker Universitetssykehus

Oppgaven ble utført ved:

Seksjon for dopinganalyse

Hormonlaboratoriet, Aker Universitetssykehus



## Forord

Jeg vil gjerne takke alle på Seksjon for dopinganalyse for et lærerikt år. Tusen takk for all hjelp!

Jeg vil spesielt takke veilederne mine John Henninge og Peter Hemmersbach for god veiledning gjennom hele året og Ingunn Hullstein for god hjelp og støtte underveis.

Takk til min kontorvenn Michelle Lindøe. Det har vært veldig koselig å dele kontor med deg og jeg har satt pris på både de faglige og sosiale samtalene vi har hatt.

Takk til fotballspillerne i Skeid som frivillig stilte opp og husket å ta med seg urinprøvene på treningene.

Takk til Lise Aksglæde ved København Universites Hospital for villig å dele sitt urinmateriale med meg.

Sist, men ikke minst vil jeg takke Nils-Kristian. Tusen takk for all støtte og hjelp det siste året!

Oslo, oktober 2007

Ingvild Liborg



# Innholdsfortegnelse

<b>Forkortelser .....</b>	<b>9</b>
---------------------------	----------

<b>Sammendrag .....</b>	<b>11</b>
-------------------------	-----------

<b>1. Innledning .....</b>	<b>13</b>
----------------------------	-----------

1.1. Doping generelt.....	13
1.2. Steroidprofil .....	14
1.3. Steroider .....	15
1.3.1. Biosyntese.....	16
1.3.2. Metabolisme .....	18
1.4. Analyse av endogene steroider.....	20
1.4.1. Intern standard .....	20
1.4.2. Fastfase ekstraksjon.....	21
1.4.3. Væske-væske ekstraksjon .....	22
1.4.4. Hydrolyse .....	22
1.4.5. Derivatisering .....	23
1.4.6. Gasskromatografi .....	23
1.4.7. Massespektrometri .....	23
1.4.8. Identifikasjon og kvantifisering.....	25
1.5. Problemstilling.....	25

<b>2. Eksperimentelt .....</b>	<b>27</b>
--------------------------------	-----------

2.1. Forsøkspersoner .....	27
2.2. Gjennomføringen av forsøket.....	27
2.3. Kjemikalier og utstyr.....	28
2.4. Løsninger.....	29
2.4.1. Bruksløsninger .....	29
2.4.2. Derivatiseringsløsninger .....	30
2.4.3. Internstandard .....	30
2.4.4. Kalibratorløsninger .....	31
2.5. Metodeutvikling .....	33
2.5.1. Forarbeid .....	33
2.5.2. Prøveopparbeidelsen. ....	34
2.6. Analyseparametre.....	36
2.6.1. Instrument: GC-MS.....	36
2.7. Identifikasjon og kvantifisering.....	37
2.8. Validering .....	38
2.8.1. Selektivitet/Spesifisitet.....	38
2.8.2. Linearitet.....	38
2.8.3. Presisjon og nøyaktighet .....	39
2.8.4. Gjenvinning (recovery) .....	40
2.8.5. LOD og LOQ .....	40
2.9. Identifikasjon og kvantifisering.....	41

<b>3. Resultater.....</b>	<b>43</b>
3.1. Validering .....	43
3.1.1. Linearitet .....	43
3.1.2. Presisjon og nøyaktighet.....	43
3.1.3. Gjenvinning (recovery).....	44
3.1.4. LOD og LOQ.....	45
3.2. Fremstilling av resultatene fra prøvene .....	45
3.3. Prøvene fra Danmark .....	46
3.4. Prøvene fra fotballspillerne.....	54
3.5. Ratioer i prøvene fra Danmark .....	61
3.6. Ratioer i prøvene fra fotballspillerne.....	63
<b>4. Diskusjon .....</b>	<b>67</b>
4.1. Valideringen .....	67
4.2. Forsøket .....	68
4.2.1. Prøvene fra Danmark.....	69
4.2.2. Prøvene fra fotballspillerne .....	69
4.2.3. Stoffene .....	70
4.2.4. Ratioer .....	73
4.2.5. Nye statistiske metoder.....	74
<b>5. Konklusjon .....</b>	<b>77</b>
<b>Referanser.....</b>	<b>79</b>



## Forkortelser

AAS	anabol-androgene steroider
CV	relativt standardavvik
D	deuterium
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHT	dihydrotestosteron
EI	elektronionisasjon
EPO	erytropoetin
GC	gasskromatografi
IOC	International Olympic Committee
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometry (Isotop ratio massespektrometri)
LOD	limit of detection (deteksjonsgrense)
LOQ	limit of quantification (kvantifiseringsgrense)
$m/z$	masse/ladning
mg	milligram
ml	milliliter
MS	massespektrometri
MSTFA	N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoracetamid
ng	nanogram
SIM	selective ion monitoring
T/E	testosteron/epitestosteron
TIC	total ion current (totalt ionstrømskromatogram)

## Forkortelser

---

TBME	<i>tert</i> -butylmetyleter
WADA	World Anti-Doping Agency
μl	mikroliter

## Sammendrag

Bakgrunnen for oppgaven var ønske om å etablere en kvantitativ metode for analyse av endogene steroider, som kan brukes i forbindelse med steroidprofilering av idrettsutøvere. Det var i denne sammenhengen også ønske om å etablere normalverdier for de endogene steroidene og ratioene mellom utvalgte steroider.

De endogene steroidene av interesse i denne sammenhengen er 5 $\alpha$ -androstandiol, 5 $\beta$ -androstandiol, 6 $\beta$ -hydroksyandrosteron, 6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon, 11 $\beta$ -hydroksyandrosteron, 11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon, androsteron, dehydro-epiandrosteron, dihydrotestosteron, epitestosteron, etiokolanolon, pregnandiol, pregnantriol, testosteron og østron. I tillegg til disse stoffene er testosteron/epitestosteron, 5 $\alpha$ -androstandiol/5 $\beta$ -androstandiol og androsteron/etiokolanolon ratioene interessante da de gir ekstra informasjon om hvilke stoffer som eventuelt blir brukt.

En kvantitativ metode, med deutererte internstandarder for de stoffene der det er å få tak i, ble utviklet og validert i henhold til de krav som blir stilt ved Seksjon for dopinganalyse.

For å bestemme normalverdier til de endogene steroidene for menn ble det rekruttert 10 frivillige fotballspillere fra et lag i Adeccoligaen som samlet morgenurin hver 14. dag i 6 måneder. Disse prøvene ble analysert og normalområdet for disse spillerne ble bestemt.

Det ble også sett på hvordan steroidprofilen utvikler seg gjennom puberteten. Dette ble gjort ved å analysere urin til gutter som var i alderen 9-20 år. Dette prøvematerialet er en del av med Den Københavnske Pubertetsundersøgelse, som foregår ved København Universitets Hospital.

Resultatene viste at ved 15 års alderen stabiliserer steroidkonsentrasjonene seg, og det normalområdet som ble etablert for fotballspillerne er for de fleste stoffene det samme som de danske ungdommene fra 15 år og oppover lå i.

Resultatene viste også at den interindividuelle variasjonen er mye større enn den intraindividuelle. Dette gir en god indikasjon på at steroidprofilering av enkeltpersoner er en god måte å oppdage bruk av endogene steroider.



# 1. Innledning

## 1.1. Doping generelt

Ordet dop stammer opprinnelig fra Sør-Afrika, og er navnet på en plantedrikk som ble brukt for å øke utholdenheten og modigheten under jakt. Ordet ble først beskrevet i en engelsk ordbok i 1889, men allerede for 5000 år siden brukte kinesiske idrettsutøvere planteekstrakter for å forbedre hjertefunksjonen i konkurranse. Et av de mest kjente midlene som ble brukt den gang er Ma huang, som er det kinesiske navnet på planten *Ephedra*. Virkestoffet i denne planten er i dag kjent som efedrin, og står i dag på dopinglisten. [1, 2]

Opp gjennom tiden har det vært brukt mange forskjellige typer dopingmidler. I det gamle Hellas ble det brukt forskjellige soppekstrakter, mens i Sør-Amerika ble kokablader tygget, og i Vest-Afrika har de brukt planteekstrakter i flere århundrer. I Europa ble forskjellige "mirakeldrikker" brukt. Disse mirakeldrikkene varierte fra idrett til idrett, og inneholdt blant annet stryknin, koffein og alkohol. [1, 2]

Etter andre verdenskrig har flere nye dopingmidler blitt utviklet og dopingen har spredt seg til flere idretter. Amfetaminliknende stoffer og anabol-androgene steroider (AAS) ble etter hvert de mest brukte dopingmidlene. [1-3] Det ble utviklet gode metoder for å oppdage bruk av disse midlene, noe som førte til at andre midler ble tatt i bruk i dopingsammenheng. Spesielt midler som øker nivåene av hemoglobin og som fører til økt opptak av oksygen, slik som blodtransfusjoner og etter hvert erytropoetin (EPO) i rekombinant form, ble populært.[4]

I 1963 kom Europarådet med den første definisjonen av doping, og det første offisielle antidopingarbeidet ble satt i gang i 1967. [1, 2]

I dag er det World Anti-Doping Agency (WADA) som definerer hvilke stoffer og metoder som omfattes av anti-dopingregulverket og WADA gir hvert år ut en liste med de forbudte stoffene og metodene, f. eks manipulering av prøver og kunstige måter å øke oksygenopptaket på. [5, 6] Det er også brudd på dopingbestemmelsene å ikke avgi prøve når dette blir krevd. Dette innbefatter også

at utøveren til enhver tid skal oppgi hvor vedkommende befinner seg, slik at det kan gjennomføres uanmeldte kontroller utenfor konkurranse. [7]

Laboratorier som skal analysere dopingprøvene må være akkreditert. Det vil si at laboratoriet må dokumentere ovenfor et objektivt organ at analysemetodene som blir brukt er egnet til oppgaven og validert i samsvar med internasjonale retningslinjer.

Akkrediteringen skal gjøres både av WADA og en nasjonal akkrediteringsmyndighet. Seksjon for dopinganalyse ved Aker sykehus ble første gang akkreditert som et dopinglaboratorium i 1988. [1, 6]

## 1.2. Steroidprofil

Bruken av AAS var utbredt allerede i begynnelsen av 1970-tallet. Frem til 1974 fantes det ingen god metode for å oppdage bruken av disse. I 1974 kom de første metodene som kunne oppdage bruk av anabole steroider, noe som førte til at disse kom på dopinglisten i 1976.

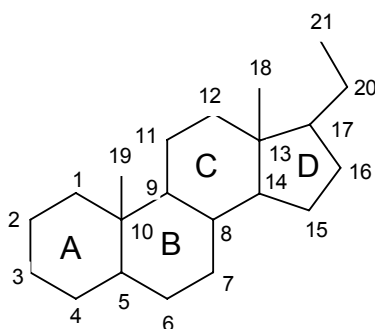
Behovet for å ha en metode som kunne detektere bruk av testosteron var opphavet til bruken av steroidprofil i dopingsammenheng. [8]

Den medisinske komiteen i IOC (the International Olympic Committee) bestemte i 1982 at dersom dopingprøve hadde en testosteron/epitestosteron (T/E) ratio på mer enn 6, så forelå det mistanke om testosteron bruk. Og utøveren skulle følges over lengre tid for å bestemme den naturlige T/E ratioen til utøveren. [4] Denne grensen er nå blitt senket til 4. Siden 1982 har steroidprofilering vært en del av rutineanalysen under en dopingkontroll. Androsteron og etiokolanolon ble også inkludert i denne profilen, sammen med noen andre endogene steroider, for også å kunne påvise bruk av testosteron, dehydroepiandrosteron (DHEA), androstendiol, androstendion og dihydrotestosteron (DHT). [8, 9]

Testosteron, som er en endogent stoff og innehar anabole effekter, kom ikke på dopinglisten før i 1982. Dette kan ha sammenheng med at det å kvantifisere testosteron alene for å oppdage misbruk av testosteron ikke ga tilfredsstillende resultater. Dette skyldes den metabolske turn-over raten, døgnvariasjon i testosteronutskillelsen og en interindividuell forskjeller i utskillelsesraten. Donike et al. introduserte T/E ratioen, da de fant at administrering av testosteron ikke økte nivåene av epitestosteron. Epitestosteron er ikke en metabolitt av testosteron og forblir derfor tilnærmet upåvirket ved testosteron administrering. [9, 10]

### 1.3. Steroider

Steroider er stoffer som har et karbonskjelett med cyklopentafenantren struktur, eller som kan avledes fra denne strukturen. Tre 6-kantede ringer utgjør fenantrenkjernen, som er bundet sammen med cyklopentanringen. Denne stoffklassen inkluderer stoffer som steroler (f. eks kolesterol), gallsyrer, kjønnshormoner (f. eks androgener og østrogener), vitamin D og kortikosteroider. [11]



Figur 1 Viser et nummerert steroidkjelett

Ringstrukturene tegnes gjerne i planet, og grupper eller atomer som går inn i planet betegnes som  $\alpha$  (alfa), og blir tegnet med en stiplet linje. Grupper som går ut av planet betegnes som  $\beta$  (beta), og blir tegnet som en kile, eller som en heltrukket strek. Dersom det er usikkert hvilken posisjon gruppen står i, eller den kan inneha begge posisjoner vil bindingen bli tegnet som en sikksakk-strek.

Det blir også angitt i navnet om steroidene inneholder en eller flere dobbeltbindinger. Dersom endingen til gruppenavnet er  $-an$ , f. eks androstandiol, angir dette at det ikke er dobbeltbinding, mens endelsen  $-en$ , f. eks androstendiol, indikerer at det er en dobbeltbinding i steroidkjelettet.

Hvor dobbeltbindinger og grupper befinner seg i strukturen, angis med nummeret til karbonatomet som bindingen eller gruppen går ut ifra. Androst-4-en-3,17-dion har dermed en dobbeltbinding som starter i C-4 og går til C-5, og oksogrupper som går ut i fra C-3 og C-17.

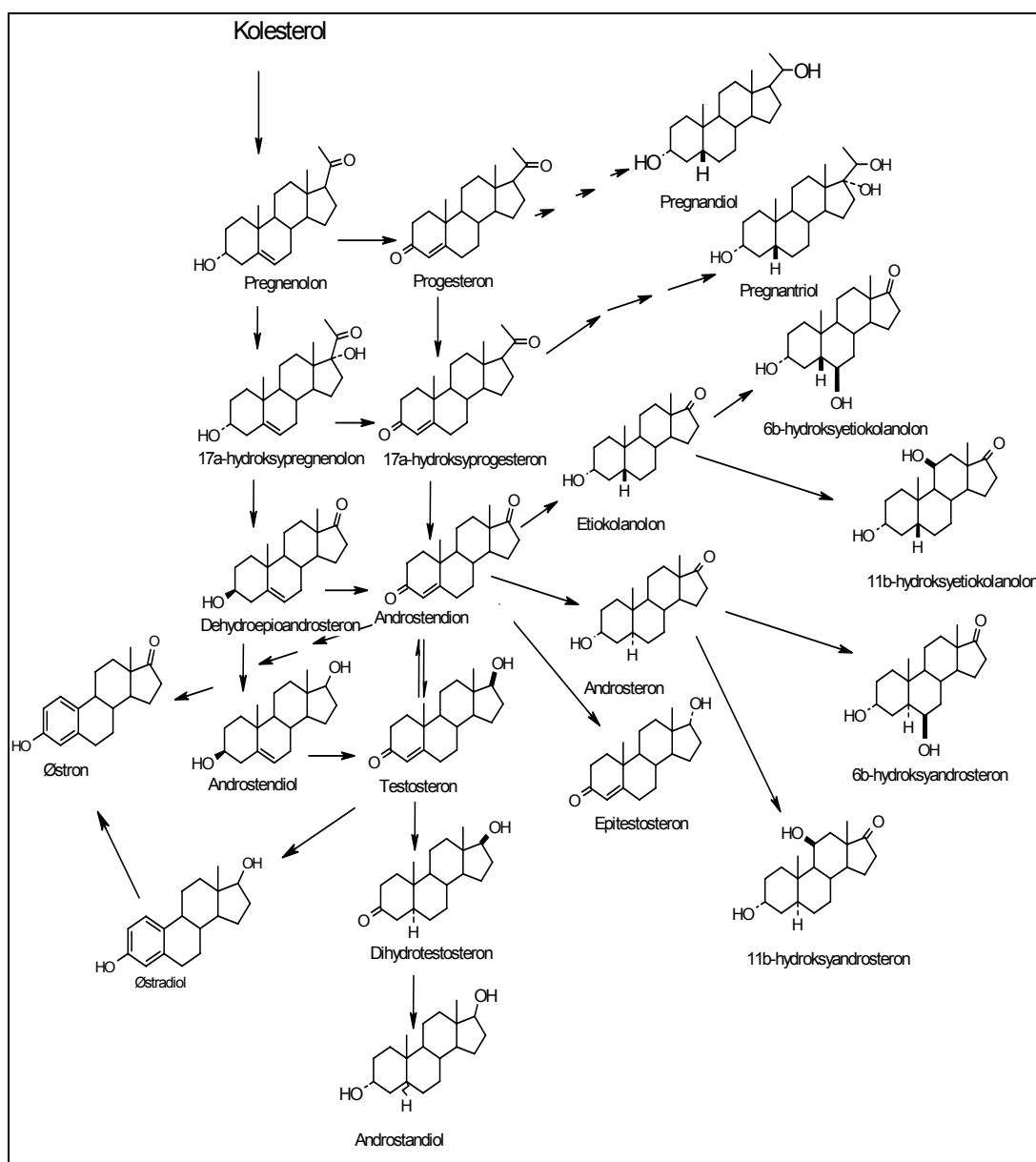
På bakgrunn av strukturelle forskjeller, deles steroidhormonene inn i grupper, basert på hvilket stoff de er derivater av; estran (for østrogenerene), androstan (for androgenerene) og pregnan (for kortikosteroidene og progesteronene). Kjemisk sett er androstanene  $C_{19}$  forbindelser, estranene  $C_{18}$  forbindelser, som mangler en

metylgruppe på C-10, og pregnaner er C<sub>21</sub> forbindelser som innehar en β-etyl sidegruppe i C-17. [11] C<sub>19</sub>, C<sub>18</sub> og C<sub>21</sub> angir antall karbonatomer i forbindelsen.

### 1.3.1. Biosyntese

I menn og kvinner blir steroidhormonene syntetisert fra kolesterol i binyrebarken og i kjønnsorganene. Hvilke og hvor mye steroidhormoner som blir produsert varierer, avhengig av aktiviteten til forskjellige enzymsystemer, som kan varierer fra person til person og er avhengig av arv. [11] Andre faktorer som spiller inn på utskillelsen er blant annet alder og kjønn.

Biosyntesen for stoffene i denne oppgaven er vist i figur 2.



Figur 2 Biosyntese av steroidhormoner



**Testosteron (17 $\beta$ -hydroksyandrost-4-en-3-on)**

Testosteron er det viktigste androgene steroidet. Hos menn foregår produksjonen hovedsakelig i Leydigcellene i testiklene, og produksjonen av dette steroidet øker gjennom puberteten. Testosteron har en direkte innvirkning på noen aspekter av den sekundære kjønnsutviklingen hos menn, som senkning i stemmeleie og økt muskelmasse. [12]

**Dihydrotestosteron (17 $\beta$  hydroksy-5 $\alpha$ -androstan-3-on)**

Dihydrotestosteron (DHT) er en metabolitt av testosteron. Enzymet 5 $\alpha$ -reduktase omdanner testosteron til DHT. DHT er mer potent enn testosteron grunnet en økt affinitet til androgenreseptorene. [13] Selv om det er et potent androgent stoff, har bruken i dopingsammenheng vært begrenset, da det ikke ser ut som om stoffet innehar noen særlig anabol effekt. [14]

**Epitestosteron (17 $\alpha$ -hydroksyandrost-4-en-3-on)**

Epitestosteron er 17 $\alpha$ -isomeren til testosteron. Den er ikke en metabolitt av testosteron, men er mest sannsynlig en metabolitt av androstendion. Det er vist at halvparten av den totale epitestosteronproduksjonen hos menn har et testikulært opphav, mens de resterende 50 % er det fortsatt noe usikkerhet om. [9] Epitestosteron har ingen androgen effekt i seg selv, men blir i dopingsammenheng brukt som et maskeringsmiddel, for å skjule bruk av testosteron. [15] Dette kan gjøres ved å innta testosteron og epitestosteron sammen, i et forhold som gjør at T/E-ratioen forblir under grensen på 4.

**Dehydroepiandrosteron (3 $\beta$ -hydroksyandrost-5-en-17-on)**

Dehydroepiandrosteron (DHEA) er en forløper til testosteron, og produseres i binyrene og i kjønnsorganene. DHEA kan bli metabolisert til testosteron og dihydrotestosteron i målorganer. DHEA er det androgene steroidet som det blir skilt ut i størst mengde fra binyrebarken. [11] Dette gjenspeiler seg ikke i konsentrasjonene målt i denne studien, da det her blir sett på glukuronidene, og ettersom DHEA er en 3 $\beta$ -hydroksyforbindelse, blir DHEA hovedsakelig sulfatert, se kapittel 1.3.2.

Økte nivåer av DHEA, vil igjen føre til økt produksjon av testosteron. [9] DHEA har i seg selv en svak androgen effekt, og bare en minimal mengde, omtrent 1 % blir omdannet til testosteron. [15]

**17-oksosteroidene**

**Androsteron** (3 $\alpha$ -hydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-on) og **etiokolanolon** (3 $\alpha$ -hydroksy-5 $\beta$ -androstan-17-on) er hovedmetabolittene til androstendion, DHEA og testosteron.

Disse metabolittene blir hovedsaklig utskilt i urin (>90 %). Halvparten av steroidmaterialet som blir skilt ut i urin er 17-oksosteroider, mens den siste halvparten er i form av dioler, trioler, og andre polare metabolitter. [12] I tillegg til androsteron og etiokolanolon finnes også følgende 17-oksosteroider i urin: **6β-hydroksyandrosteron** (3α,6β-dihydroksy-5α-androstan-17-on), **6β-hydroksy-etiokolanolon** (3α,11β-dihydroksy-5β-androstan-17-on), **11β-hydroksyandrosteron** (3α,11β-hydroksy-5α-androstan-17-on) og **11β-hydroksyetiokolanolon** (3α,11β-hydroksy-5β-androstan-17-on). De sistnevnte stoffene er av interesse i dopingsammenheng, da de er blitt foreslått som markører for å detektere misbruk av androstendion. [16, 17]

### **Androstandiol (5α/5β-androstan-3α,17β-diol)**

Androstandiol er metabolitt av testosteron og dihydrotestosteron. Stoffet foreligger som to isomere, 5α- og 5β-androstandiol. Disse utgjør bare omtrent 4 % av den totale mengde testosteronmetabolitter. De er også metabolitter av andre endogene steroider, bla etiokolanolon og androsteron. [15]

### **Pregnandiol (5β-pregnan-3α,20α-diol)**

Pregnandiol er en metabolitt av progesteron. Den er biologisk inaktiv, men utskillelsen i urin kan bli brukt som et mål for den endogene produksjonen av progesteron, da forholdet mellom progesteron og pregnandiol korrelerer i de fleste kliniske situasjoner. [12]

### **Pregnantriol (5β-pregnan-3α,17α,20α-triol)**

Pregnantriol er en metabolitt av 17α-hydroksyprogesteron, og skilles ut i urin. [18] 17α-hydroksyprogesteron er en forløper til androstendion.

### **Østron (3-hydroksyestra-1,3,5(10)-trien-17-on)**

Østron utgjør sammen med østradiol og østriol de tre naturlig forekommende østrogenene. Østron er en metabolitt av både androstendion og testosteron. [12]

## **1.3.2. Metabolisme**

### **Fase I metabolisme**

Fase I reaksjoner omgjør vanligvis steroidene, ved hjelp av enzymatiske reaksjoner (f. eks oksidasjoner, reduksjoner eller hydroksyleringer), til mer polare eller inaktive stoffer, som gjør det lettere for kroppen å skille stoffene ut.

### **A-ringen**

5α- og 5β-reduksjon av C-4,5 dobbeltbindingen i 3-okso-4-en steroidene, som f. eks testosteron, er det hastighetsbestemmende trinnet i metabolismen av disse

typer steroider. Denne reduksjonen gir et asymmetrisk senter i C-5, noe som muliggjør dannelsen av to isomere, en med 5 $\alpha$ - og en med 5 $\beta$ -konfigurasjon.

Umiddelbart etter den irreversible reduksjonen av dobbeltbindingen, reduseres 3-oksogruppen ved hjelp av enten 3 $\alpha$ -hydroksysteroid dehydrogenase eller 3 $\beta$ -hydroksysteroid dehydrogenase. Dette er en likevektsreaksjon og det samme enzymet omdanner også 3-hydroksygrupper til 3-oksogruupper.

### **D-ringen**

Oksidasjon av 17 $\beta$ -hydroksygruppen skjer ved hjelp av enzymet 17 $\beta$ -hydroksysteroid dehydrogenase. Denne reaksjonen gir 17-oksosteroider, som er hovedmetabolittene til testosteron i urin. Dette er den mest kjente metabolske vei for 17 $\beta$ -hydroksy-steroidene, men også andre metabolske veier eksisterer.

17-Oksogruppen kan tilbakedannes til en hydroksylgruppe ved hjelp av det samme enzymet, men denne likevekten avhenger av hastigheten av andre metabolismetrinn, som for eksempel 17 $\beta$ -konjugeringen og reduksjonen i A-ringen.

Reduksjon av 17-oksosteroider skjer i liten grad, og den mest kjente metabolitten, som understøtter at dette skjer, er epitestosteron. Dannelsen av epitestosteron antas å være et sideprodukt i dannelsen av testosteron via androstendion. [19]

### **Fase II metabolisme**

Fase II metabolisme er konjugeringsreaksjoner, der steroidene og deres metabolitter, som i utgangspunktet er veldig upolare og lite vannløselige, kobles til glukuronsyre eller sulfat, ved hjelp av forskjellige enzymer. Formålet med disse reaksjonene er å gjøre stoffene mer vannløselige og dermed lettere å skille ut i fra kroppen via urin.

### **A-ringen**

Reduksjonen av 3-oksogruppen gir hovedsakelig 3 $\alpha$ -hydroksy konfigurasjon, og disse konjugeres med glukuronsyre uavhengig om steroidet har 5 $\alpha$ - eller 5 $\beta$ -konfigurasjon. 3 $\beta$ -hydroksysteroider skilles derimot hovedsakelig ut som sulfater.

### **D-ringen**

I 17 $\beta$ -hydroksysteroider kan 17 $\beta$ -hydroksygruppen konjugeres med glukuronsyre eller sulfat. [19]

## 1.4. Analyse av endogene steroider

Biologiske væsker, som urin, er komplekse blandinger som inneholder blant annet proteiner og salter. Dette gjør at opparbeidelsen av prøven er viktig for å få den spesifisiteten man ønsker for metoden. Det finnes flere grunner til at analyse av komplekse blandinger er problematisk uten tilstrekkelig opparbeidelse:

- Blandingen kan inneholde stoffer som interfererer med deteksjonen av de aktuelle stoffene.
- Blandingen kan inneholde stoffer som ødelegger analysesystemet.
- Analyttenes konsentrasjon i blandingen kan være så lav at de vanskelig kan detekteres.

Det finnes flere måter å løse disse problemene på. Interfererende stoffer og forurensninger kan fjernes, som man gjør i proteinfelling av fullblod, eller så kan de aktuelle stoffene isoleres. Prøveoppbeidelsen som blir brukt i denne oppgaven baserer seg på prinsippet om å isolere de aktuelle stoffene.

I mange tilfeller er også analyttene til stede i så lave konsentrasjoner at oppkonsentrering er nødvendig for å kunne detektere stoffene. [20]

### 1.4.1. Intern standard

En intern standard er et stoff som tilsettes prøveløsningen i kjent mengde før prøveoppbeidelsen startet for å korrigere for:

- tap av stoff ved prøveoppbeidelsen
- forandringer i injisert volum
- forandringer i betingelsene under kromatografisk analyse [21]

For at et stoff skal kunne fungere som en intern standard for et annet stoff, må den interne standarden:

- oppføre seg mest mulig likt analytten under prøveoppbeidelsen
- ha detektorrespons som er i samme størrelsesorden som analytten
- ha en konsentrasjon som gir lignende topphøyde eller areal som analytten
- ikke være tilstede i prøven [22]

Dersom flere stoffer i prøven skal detekteres kan det være nødvendig å tilsette flere intern standarder. Dette gjelder hvis stoffene man skal detektere er

strukturforskjellige, og/eller at retensjonstidene til stoffene spenner over et stort område.

De best egnede internstandardene ved massespektrometri (MS) som deteksjonsmetode er deutererte analoger til de stoffene som skal detekteres. Disse forbindelsene er strukturlike de stoffene som skal bestemmes, bortsett fra at noen hydrogenener i molekylet er erstattet med deuterium som er en masseenhet høyere enn hydrogen. På grunn av naturlig isotopfordeling kan man lett få overlapp fra analytten til den deutererte standarden. Denne interferensen kan reduseres ved å erstatte minst 3 hydrogenatomer med deuterium slik at forskjellen i masse blir på 3 masseenheter. Deuteriumanalogene skal ideelt sett koeluere med analyttene, men det viser seg at de ofte eluerer litt tidligere. [23]

I denne studien ble deutererte internstandarder benyttet for de analyttene der dette var mulig å få tak i. For de resterende analyttene ble det brukt den internstandard som oppførte seg mest mulig likt. Tabell 1 viser de hvilke internstandarder som ble brukt til de ulike analyttene.

Tabell 1 Analytt og tilhørende internstandard

Analytt	Internstandard
5 $\alpha$ -androstandiol	D <sub>3</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol
5 $\beta$ -androstandiol	D <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	D <sub>3</sub> -testosteron
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	D <sub>3</sub> -testosteron
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	D <sub>3</sub> -testosteron
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	D <sub>3</sub> -testosteron
Androsteron	D <sub>4</sub> -androsteron
DHEA	D <sub>3</sub> -epitestosteron
DHT	D <sub>3</sub> -testosteron
Epitestosteron	D <sub>3</sub> -epitestosteron
Etiokolanolon	D <sub>5</sub> -etiokolanolon
Pregnanliol	Metyltestosteron
Pregnantriol	Metyltestosteron
Testosteron	D <sub>3</sub> -testosteron
Østron	D <sub>3</sub> -epitestosteron

#### 1.4.2. Fastfase ekstraksjon

Fastfase ekstraksjon baserer seg på stoffers evne til å fordele seg mellom overflaten av et fast stoff (sorbent) og en væske. For å kunne isolere de aktuelle stoffene på overflaten av sorbenten forutsettes det at sorbenten inneholder kjemiske grupper som gir interaksjoner med stoffene. Disse interaksjonene må være sterkere enn interaksjonene mellom væsken og stoffet. Samtidig bør ikke sorbenten inneholde funksjonelle grupper som interagerer med stoffer i matrisen som ikke er interessante.

Gjennomføringen av en fast-fase ekstraksjon foregår i fire trinn. Først må kolonnen kondisjoneres, for å forberede kolonnen på å ta imot prøven. Dette gjøres ved at

kolonnen fuktes med et organisk løsemiddel, for eksempel metanol. Det organiske løsningsmiddelet må vaskes ut av kolonnen med et vandig løsningsmiddel før prøvopåsettingen kan finne sted. Når prøveløsningen er satt på, går prøven gjennom kolonnen, og de aktuelle stoffene blir holdt tilbake. Siden komponenter med svakere interaksjon enn analyttene også kan bli holdt tilbake, er det viktig å la en vaskeløsning gå gjennom kolonnen etter prøvopåsettingen for å skylle ut disse stoffene. Siste trinn i ekstraksjonen er elueringen hvor det foregår en selektiv desorpsjon av analyttene. Elueringsmidlet bør være så sterkt at det bryter bindingene mellom analyttene og sorbenten, men ikke så sterkt at det eluerer forurensninger som retarderes sterkere av sorbenten enn det analyttene gjør. I denne studien blir metanol brukt som eluent.

Siden steroider er upolare stoffer, brukes en C<sub>18</sub> kolonne som er upolar og som vil gi upolare interaksjoner med stoffene. [24]

### 1.4.3. Væske-væske ekstraksjon

Væske-væske ekstraksjon baserer seg på prinsippet om at et stoff vil fordele seg mellom to ikke-blandbare faser. Ved velge rett løsningsmiddel, pH og ionestyrke vil man kunne optimalisere ekstraksjonene med tanke på utbytte.

Oftest er man også interessert i å dampe av løsningsmiddelet i etterkant, så det lønner seg derfor å velge et lett flyktig løsningsmiddel. [25]

Matriksen i denne studien er urin, og det vil derfor være optimalt med en organisk fase som løser de stoffene vi er interessert i, og minst mulig av andre stoffer. Dietyleter, *tert*-butylmetyleter (TBME) og pentan er egnede som organiske faser, da disse er relativt upolare og vil trekke de upolare steroidene over. [9] Pentan er den organiske fasen som vil være mest spesifikk for de fleste av steroidene. Men sannsynligheten for å miste de mer polare stoffene, som østron og pregnantriol, er stor. TBME ble derfor valgt som organisk fase i denne studien, mens pentan oftest blir brukt i analyser der eventuelle funn i en screeninganalyse skal bekreftes.

### 1.4.4. Hydrolyse

Siden steroider i stor grad skilles ut i urinen konjugert med glukuronsyre, er det nødvendig å spalte disse konjugatene. Dette gjøres med enzymatisk hydrolyse. Det finnes flere forskjellige metoder som kan være aktuelle for hydrolyse av steroider. Før var det vanlig å bruke et ekstrakt fra *Helix pomatia*, som både har en  $\beta$ -glukuronidase og en arylsulfatase aktivitet. Men dette ekstraktet har også vist en  $3\beta$ -hydroksysteroid dehydrogenase og en 3 oksosteroid-5,4-isomerase aktivitet, noe som gjør den uegnet i dopinganalyser, der man er ute etter glukuronidfraksjonen. Det mest brukte enzymet, og som også er brukt i denne studien, kommer fra

bakterien *E. coli*, og har en ren  $\beta$ -glukuronidase aktivitet, og ingen arylsulfatase aktivitet. Dette gjør at det bare sees på glukuronidfraksjonen av metabolittene. [9]

For å ha kontroll på hydrolysen ble D<sub>3</sub>-DHT-glukuronid brukt i internstandard. Ved å se på forholdet mellom D<sub>3</sub>-DHT og D<sub>3</sub>-testosteron i prøven ga dette en indikasjon på hvor fullstendig hydrolysen var. Ved fullstendig hydrolyse lå dette forholdet rundt 0,3.

#### 1.4.5. Derivatisering

Hensikten med derivatiseringen er å lage flyktige og termisk stabile derivater av analyttene, slik at de blir mer egnet for gasskromatografi. Dette gjøres vanligvis ved å omdanne protiske funksjonelle grupper til termisk stabile upolare grupper. Uønskede kolonneinteraksjoner som kan gi adsorpsjon og haledannelse unngås, samtidig som økt detekterbarhet for stoffene kan oppnås. [26]

Det er vist at N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) er det derivatiseringsreagenset som er best egnet for steroider, siden det minimerer dannelsen av multiple derivater. [27] MSTFA vil erstatte aktive H-atomer i hydroksylgruppene på steroidene med en trimetylsilylgruppe. Dette kan også skje på oksygenet i oksogrupper, ved en keto-enol tautomerisering. Det dannes da derivater som er termisk stabile og flyktige, noe som gjør derivatene velegnet for gasskromatografi. [28]

#### 1.4.6. Gasskromatografi

Gasskromatografi (GC) er en separasjonsmetode som egner seg for stoffer som kan overføres til gassform. Mobilfasen, også kalt bæregass, er en inert gass som under trykk strømmer gjennom en oppvarmet kolonne. Kolonnen kan være dekket av en stasjonærfase på innsiden, kapillærkolonner, eller den kan være fylt av partikler som er dekket av stasjonærfase, pakke kolonner. Prøvene injiseres i et oppvarmet injektorkammer ved inngangen til kolonnen hvor analyttene fordamper. Bæregassen bringer dem i gassform gjennom kolonnen hvor stoffene på bakgrunn av sine fysiske egenskaper fordeler seg ulikt mellom stasjonærfase og bæregassen. Denne fordelingen fører til at de ulike analyttene vil strømme med forskjellig hastighet gjennom kolonnen og dermed separeres. Stoffene detekteres av en detektor som er plassert ved utgangen av kolonnen.

I denne studien er gasskromatografen koblet til et massespektrometer.

#### 1.4.7. Massespektrometri

I et massespektrometer måler forholdet mellom masse og ladning ( $m/z$ ). For små ioner er ladningen i de fleste tilfeller én, slik at det som i prinsippet måles er

massen. Et massespektrometer består enkelt forklart av en ionekilde som ioniserer molekylene, en masseanalysator og en detektor som registrerer signalene.

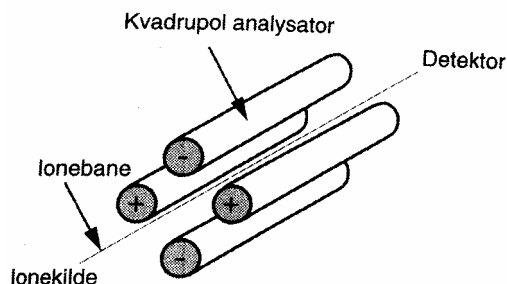
Det finnes flere ioniseringsteknikker. Den teknikken som brukes her er elektronionisasjon (EI), og er den mest brukte teknikken når massespektrometeret er detektor for gasskromatografi. Ved EI foregår ioniseringen under vakuum, ved at analytten føres inn i en stråle med elektroner som kommer fra en liten tråd (filament) av rhenium eller wolfram. Elektronene tilføres energi i et elektrisk felt som vanligvis har et potensial på 70V. Når analytten føres inn i elektronstrålen vil det i noen tilfeller rives løs et elektron fra molekylet, som følge av elektronisk frastøtning. Det vil da dannes et molekyllion med ladningen  $M^+$ . De aller fleste molekyllionene som blir dannet er veldig ustabile og de vil fort spaltes og danne fragmentioner. Disse fraktes videre til analysatoren og er utgangspunktet for massespektrumet som dannes.

Massespektrometeret kan i kombinasjon med kromatografi operere etter to prinsipper. Det kan enten tas opp fulle massespektra under hele separasjonen ("full scan"), eller det kan måles kontinuerlig på en eller flere masser. "Full scan" er gunstig dersom det er ønskelig å innhente mye strukturinformasjon om de separerte forbindelsene. Det bør tas opp spektra med korte mellomrom, f. eks 1-5 spektra per sekund, på den måten vil hver kromatografisk topp være tilstrekkelig godt definert. Etter analysen dannes det et kromatogram som viser en topp for hvert av de separerte stoffene. Hver topp vil da også ha et tilhørende massespektrum. Kromatogrammet plottes ved at alle de registrerte ionenes intensitet summeres og plottes som funksjon av retensjonstiden. Dette gir et totalt ionestrøms kromatogram ("total ion current", TIC). Ulempen med "full scan" er at følsomheten begrenses, og det kan være vanskelig å detektere analytter i veldig lave konsentrasjoner.

Ved analyser på lave konsentrasjonsnivåer og ved kvantitative analyser er det derfor ikke vanlig å ta opp fulle massespektra. I stedet innstilles massespektrometeret til kun å måle på en eller noen få masser gjennom hele separasjonstiden. Dette kalles selektiv ionemonitorering ("selective ion monitoring", SIM). Det vil nå lages et massekromatogram som viser intensiteten til den utvalgte massen som funksjon av retensjonstiden. Det er bare de stoffene i prøven som har de utvalgte massene som vil detekteres, alle andre stoffer vil ikke vises.

Det finnes flere prinsipper for å bestemme massen. I denne studien ble kvadrupolprinsippet benyttet. Figur 3 viser en skjematisk tegning av en kvadrupol.





Figur 3 Kvadrupol [29]

En kvadrupol består av 4 staver, hvor alle er parallelle. De to motstående stavene utgjør et stavpar og er koblet sammen elektrisk. De to stavparene er pålagt en likespenning. Det er også pålagt en vekselspanning i radiofrekvensområdet mellom et stavpar og det andre. Ved et bestemt forhold mellom likespenningen og vekslespenningen vil bare en  $m/z$ -verdi skape en stabil oscillasjon gjennom stavene, og ionene med denne  $m/z$ -verdien vil da gå gjennom kvadrupolen og inn i detektoren.

#### 1.4.8. Identifikasjon og kvantifisering

Identifikasjonen av stoffene foregår ved at man velger ut to ioner som er karakteristiske for analytten. Deretter sammenlignes retensjonstiden og forholdet mellom de to ulike ioneintensitetene som er valgt for analytten med en positiv kontrollprøve.

Kvantifiseringen baserer seg på prinsippet om at arealet under en topp i massekromatogrammet er proporsjonal med konsentrasjonen av stoffet i prøven. Det lages en kalibreringskurve der prøver med kjente konsentrasjoner blir analysert og kurven lages ut i fra forholdet mellom toppen på analytten og internstandard. Denne kurven bør minst ha 5 punkter og dekke det ønskede konsentrasjonsområdet. Ut i fra denne kurven kan konsentrasjonen i til stoffet i en prøve beregnes. [22, 30]

### 1.5. Problemstilling

Steroidprofilering har vært en del av rutineanalysene ved de fleste dopinglaboratorier siden 1980-tallet. Ønske om en mer utstrakt bruk av steroidprofilen har skapt et behov for en bedre kvantifisering av de endogene steroidene. Metodene som blir brukt i dag har en internstandard, og en ett-punkts

kalibrering. Dette er ikke tilfredsstillende når det skal rapporteres verdier og ikke bare hvorvidt en prøve ligger over eller under en grense.

Hensikten med denne oppgaven var å etablere en kvantitativ screeninganalyse for endogene stoffer med deutererte internstandarder for de stoffene der dette var mulig, og hvor kalibreringskurven har 5 punkter.

Det var også ønskelig å finne normalområdet for stoffene, slik at det er definert hvilket konsentrasjonsområde det kan forventes å finne de ulike steroidene i. Siden flere og flere unge idrettsutøvere blir dopingtestet, er det også interessant å se på hvordan konsentrasjonene av steroidene er gjennom puberteten.

En viktig del av steroidprofilen er også noen ratioer. Dette gjelder da spesielt, T/E, 5 $\alpha$ -androstadiol/5 $\beta$ -androstadiol og androsteron/etiokolanolon. Det også ønskelig å se på normalområdene for disse ratioene.

## 2. Eksperimentelt

### 2.1. Forsøkspersoner

I denne studien er det to grupper med forsøkspersoner. Den ene gruppen er barn/ungdom i alderen 9-20 år. Disse prøvene er samlet inn i forbindelse med "Den Københavnske Pubertetsundersøgelse", som foregår ved København Universitets Hospital.

Den andre gruppen er 10 fotballspillere fra et lag i Adeccoligaen. Spillerne er i alderen 17-28 år. De er friske frivillige, som ikke har brukt steroider. De ble informert om formålet med prosjektet, og leverte inn et skjema der de gjorde rede for eventuelle medisiner som de gikk på. Ingen brukte medisiner som påvirker steroidprofilen. Det ble utført en vanlig screeninganalyse for AAS av alle fotballspillerne før prøvene ble analysert. Alle fotballspillerne testet negativt med hensyn på bruk av AAS.

### 2.2. Gjennomføringen av forsøket

Prøvene fra Danmark ble delt inn i aldersbestemte grupper, 9-11 år, 12-14 år, 15-17 år og 18-20 år. Det resulterte i mellom 22 og 35 prøver per gruppe. Det er en prøve per person og prøvene er spoturin tatt om morgenen. Prøvene ble sendt fra Danmark i frosset tilstand med bud, og ble satt på fryserom til de ble analysert.

Fotballspillerne skulle samle morgenurin hver 14. dag i 6 måneder. De fikk beskjed om å oppbevare urinprøven kjølig hjemme til den skulle leveres. Prøvene ble oppbevart på fryserom til alle prøvene var samlet og analysen kunne begynne.

## 2.3. Kjemikalier og utstyr

Tabell 2 Steroidene som ble benyttet og deres leverandører

Steroider	Leverandør
D <sub>3</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>4</sub> -androsteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -DHT glukuronid	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -epitestosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>5</sub> -etiokolanolon	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -testosteron	Australian Government National, Pymble, Australia Measurement Institute
Metyltestosteron	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland
5 $\alpha$ -androstandiol	Steraloids, Rhode Island, USA
5 $\beta$ -androstandiol	Steraloids, Rhode Island, USA
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland
Androsteron	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland
Dehydroepiandrosteron	Steraloids, Rhode Island, USA
Dihydrotestosteron	Steraloids, Rhode Island, USA
Epitestosteron	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland
Etiokolanolon	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland
Pregnandiol	Oraganon, Oss, Nederland
Pregnantriol	Mann Research laboratories, New York, USA
Testosteron	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland
Østron	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Tyskland

Tabell 3 Kjemikalier til prøveopparbeidelsen

Kjemikalier	Leverandør
Aceton	VWR International AS, Kalbakken, Norge
Ammoniumjodid	Fluka Chemika, Steinheim, Sveits
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat x2H <sub>2</sub> O	Merck Eurolab AB, Stockholm, Sverige
Eddiksyre	VWR International AS, Kalbakken, Norge
Etantol	Merck-Schuehardt, Hohenbrunn, Tyskland
$\beta$ -glukuronidase, <i>E.coli</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland
Saltsyre	VWR International AS, Kalbakken, Norge
Metanol	VWR International AS, Kalbakken, Norge
MSTFA, N-Metyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid	Macherey-Nagel, Düren, Tyskland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Tyskland
<i>Tert</i> -butylmetyleter	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tris(hydroksymetyl-)aminometan	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tørris	Yara, Oslo, Norge

Tabell 4 Utstyr til prøveopparbeidelsen

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Fast-fase kolonne	Bond Elut C18	Varian, Middelburg, Nederland
Fast-fase manifold	Visiprep	Rohn and Haas, Philadelphia, USA
Nitrogen inndampere	Dri-block DB-3	Techne, Hout, Oslo, Norge
Sentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Tyskland
Refraktometer	UR-1	Atago Co, Tokyo, Japan
Varmeskap	Termaks	VWR international, Oslo, Norge
Vekt	AG204 DeltaRange	Mettler Toledo, Oslo Norge
Whirlmikser	MS2 Minishaker	IKA, Straufen, Tyskland

Tabell 5 Utstyr til GC-MS

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Autosampler	Aglient 7683 Series Injector	Matriks, Oslo, Norge
GC	Aglient 6890 Series GC system	Matriks, Oslo, Norge
MS	Aglient 5973 <i>Network</i> Mass Selective Detector	Matriks, Oslo, Norge
Dataprogram	Aglient MSD ChemStation Software, version D0200	Matriks, Oslo, Norge

## 2.4. Løsninger

### 2.4.1. Bruksløsninger

#### 2 M eddiksyre

114 ml eddiksyre ble fortynnet med renset vann til 1000 ml i en målekolbe.

#### 6 M saltsyre

500 ml konsentrert saltsyre (12 M) ble fortynnet med renset vann til 1000 ml i en målekolbe.

#### Acetatbuffer

100 ml renset vann ble blandet med 60 ml 2M eddiksyre og 32,8 g natriumacetat ble tilsatt. pH ble justert til 5,1 med ca 5 ml 6M saltsyre ved hjelp av pH-meter.

#### 0,03 M fosfatbuffer

4,6 g kaliumdihydrogenfosfat og 5,8 g dinatriumhydrogenfosfat  $\times$  2H<sub>2</sub>O ble fortynnet med renset vann til 1000 ml i en målekolbe. pH ble sjekket med pH-papir og lå i området 6,5-7.

### 3 M trisbuffer

363 g tris(hydroksymetyl)-aminometan ble veid inn i en 1000 ml målekolbe og løst i rensert vann til totalt volum 1000 ml. Løsningen ble justert til pH 9,8 med ca 35 ml 6M saltsyre.

#### 2.4.2. Derivatiseringsløsninger

##### **Stamløsning (MSTFA:NH<sub>4</sub>:etantiol (1000:20:60) (volum:vekt:volum))**

40 mg NH<sub>4</sub>I ble veid i slipglass og tilsatt 2 ml MSTFA. Dette ble så varmet på varmeblokk ved ca 70°C til alt var løst, ca 1 time. Løsningen ble avkjølt, og tilsatt 120 µl etantiol.

##### **Bruksløsning (MSTFA:NH<sub>4</sub>:etantiol (1000:2:6) (volum:vekt:volum))**

220 µl av stamløsningen ble blandet med 2 ml MSTFA.

#### 2.4.3. Internstandard

Det ble laget 25 ml internstandardblanding ut i fra bruksløsninger og stamløsninger. Tabell 6 viser tillagningen av bruksløsningene som ble brukt i internstandardblanding. Og tabell 7 viser tillaging og sluttkonsentrasjon for internstandardblanding.

Tabell 6 Tillaging av bruksløsninger for bruk i internstandardblanding.

Stoff	Stamløsning	Uttak	Bruksløsning
D <sub>3</sub> -5α-androstandiol	1 mg/ml	500 µl	100 ng/µl
D <sub>5</sub> -5β-androstandiol	1 mg/ml	500 µl	100 ng/µl
D <sub>3</sub> -DHT-glukuronid	1 mg/ml	500 µl	100 ng/µl
D <sub>3</sub> -epitestosteron	1 mg/ml	500 µl	100 ng/µl
D <sub>3</sub> -testosteron	1 mg/ml	500 µl	100 ng/µl
Metyltestosteron	1 mg/ml	500 µl	100 ng/µl

For D<sub>3</sub>-androsteron og D<sub>5</sub>-etiokolanolon ble stamløsningen på 1 mg/ml brukt ufortynnet.

Tabell 7 Tillaging av internstandardblanding og sluttkonsentrasjon.

Stoff	Bruksløsning	Uttak	Sluttkonsentrasjon
D <sub>3</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol	100 ng/ $\mu$ l	3750 $\mu$ l	15 ng/ $\mu$ l
D <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol	100 ng/ $\mu$ l	3750 $\mu$ l	15 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -androsteron	1000 ng/ $\mu$ l	1250 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -DHT-glukuronid	100 ng/ $\mu$ l	2230 $\mu$ l	8,92 ng/ $\mu$ l (tilsvarer 5 ng/ $\mu$ l DHT)
D <sub>3</sub> -epitestosteron	100 ng/ $\mu$ l	1250 $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l
D <sub>5</sub> -etiokolanolon	1000 ng/ $\mu$ l	1250 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
D <sub>3</sub> -testosteron	100 ng/ $\mu$ l	1250 $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l
Metyltestosteron	100 ng/ $\mu$ l	1250 $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l

#### 2.4.4. Kalibratorløsninger

Det ble først lagd bruksløsninger til bruk i en standardløsning. Denne standardløsningen var utgangspunkt for kalibratorløsningene. Bruksløsningene ble lagd enten fra stamløsninger eller fra rent stoff. Tabell 8 og 9 viser hvordan disse ble lagd.

Tabell 8 Bruksløsning fra stamløsning

Stoff	Stamløsning	Uttak	Bruksløsning
DHEA	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
DHT	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Epitestosteron	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Pregnandiol	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Testosteron	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l
Østron	1 mg/ml	200 $\mu$ l	200 ng/ $\mu$ l

Tabell 9 Bruksløsning fra rent stoff:

Stoff	Innveid mengde	Løst i ml metanol	Bruksløsning
Androsteron	5 mg	1 ml	5000 ng/ $\mu$ l
Etiokolanolon	5 mg	1 ml	5000 ng/ $\mu$ l

For stoffene 5 $\alpha$ -androstandiol, 5 $\beta$ -androstandiol, 6 $\beta$ -hydroksyandrosteron, 6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon, 11 $\beta$ -hydroksyandrosteron, 11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon og pregnantriol ble stamløsningen på 1 mg/ml brukt ufortynnet videre i kalibratorløsningene.

Fra disse bruksløsningene ble en standardløsning laget, som vist i tabell 10.

Tabell 10 Tillaging av standardløsning

Stoff	Bruksløsning	Uttak	Sluttkonsentrasjon
5 $\alpha$ -androstandiol	1000 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
5 $\beta$ -androstandiol	1000 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	1000 ng/ $\mu$ l	400 $\mu$ l	40 ng/ $\mu$ l
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	1000 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	1000 ng/ $\mu$ l	750 $\mu$ l	75 ng/ $\mu$ l
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	1000 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
Androsteron	5000 ng/ $\mu$ l	1000 $\mu$ l	500 ng/ $\mu$ l
DHEA	200 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l
DHT	200 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l
Epitestosteron	200 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l
Etiokolanolon	5000 ng/ $\mu$ l	1000 $\mu$ l	500 ng/ $\mu$ l
Pregnandiol	1000 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	50 ng/ $\mu$ l
Pregnantriol	200 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l
Testosteron	200 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l
Østron	200 ng/ $\mu$ l	500 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l

Fra denne standardløsningen ble kalibratorløsningen lagd, som vist nedenfor.

#### Kalibrator 1

0,05 ml av standard ble overført til en 5 ml målekolbe, metanol ble tilsatt til totalt volum på 5 ml.

#### Kalibrator 2

0,5 ml av standard ble overført til en 5 ml målekolbe, metanol ble tilsatt til totalt volum på 5 ml.

#### Kalibrator 3

1,5 ml standard ble overført til en 5 ml målekolbe, metanol ble tilsatt til totalt volum på 5 ml.

#### Kalibrator 4

3,5 ml standard ble overført til en 5 ml målekolbe, metanol ble tilsatt til totalt volum på 5 ml.

#### Kalibrator 5

Har samme konsentrasjoner som standard.

#### Kalibreringskurve

Kalibreringskurven ble laget ut i fra konsentrasjonene i kalibratorløsningene. Tabell 11 viser konsentrasjonene som ble brukt i kalibreringskurvene.



Tabell 11 Konsentrasjonene til stoffene i kalibreringskurven

Stoff/kalibrator	1 (ng/ml)	2 (ng/ml)	3 (ng/ml)	4 (ng/ml)	5 (ng/ml)
5 $\alpha$ -androstandiol	10	100	300	700	1000
5 $\beta$ -androstandiol	10	100	300	700	1000
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	8	80	240	560	800
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	10	100	300	700	1000
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	15	150	450	1050	1500
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	10	100	300	700	1000
Androsteron	100	1000	3000	7000	10000
DHEA	2	20	60	140	200
DHT	2	20	60	140	200
Epitestosteron	2	20	60	140	200
Etiokolanolon	100	1000	3000	7000	10000
Pregnan diol	10	100	300	700	1000
Pregnantriol	2	20	60	140	200
Testosteron	2	20	60	140	200
Østron	2	20	60	140	200

## 2.5. Metodeutvikling

### 2.5.1. Forarbeid

#### Fullscan

Det ble kjørt fullscan av alle analytter og internstandarder, å få informasjon om retensjonstid, fragmentering og de mest spesifikke og intense fragmentene. Dette ble gjort ved å ta ut tilsvarende 2,5  $\mu$ g av stoffet fra en bruksløsning. Metanolen ble så dampet av og prøven ble derivatisert. Etter derivatiseringen ble prøven kjørt på GC-MS.

#### Området for kalibreringskurve

For de fleste stoffene ble det funnet normalområder i urin i litteraturen. [31, 32] Disse ble lagt til grunn for området til kalibreringskurven for disse stoffene.

For testosteron og epitestosteron har WADA satt en grense på 200 ng/ml. Over denne grensen blir prøven ansett som mistenkelig, og skal bekreftes med Isotop-ratio Massespektrometri (Isotope ratio mass spectrometry, IRMS). Øverste punkt på kalibreringskurven ble derfor satt til 200 ng/ml til disse to stoffene. [33]

For androsteron og etiokolanolon har WADA satt en grense på 10 000 ng/ml, og øverste kalibreringspunkt ble derfor satt til dette. [33]

For østron ble 25 urinprøver fra menn, som ikke er inkludert i studien, opparbeidet og analysert. Det ble samtidig opparbeidet en tre kontrollprøver som inneholdt

henholdsvis 1, 10 og 100 ng/ml østron. Resultatene fra urinprøvene ble sammenliknet med resultatene av kontrollprøvene, og området for kalibreringskurven ble bestemt ut i fra dette.

### **2.5.2. Prøveopparbeidelsen.**

Prøveopparbeidelsen fulgte den prøveopparbeidelsen som er etablert ved Seksjon for dopinganalyse for analyse av AAS. Figur 4 viser hvordan opparbeidelsen ble gjennomført.

Uttaket av prøven ble justert for spesifikk vekt. Dersom en prøve hadde en spesifikk vekt under 1,010, ble det tatt ut 5 ml istedenfor 2,5 ml.

I tillegg til prøvene, ble det også opparbeidet en kalibreringskurve og en kontrollprøve hver gang. Kontrollprøven inneholdt kjente mengder av analyttene, og ble brukt som en kontroll på kalibreringskurven.

2,5 ml prøver (spesifikk vekt <1,01 gir uttak på 5 ml)

1. + 50 µl internstandard
2. + 150 µl acetatbuffer til pH 5-6  
(justeres til 5-6 med fortynnet HCl om nødvendig – sjekk med pH papir)

Fast fase ekstraksjon:

3. Kolonner: Bond Elut C-18 200 mg
4. Kolonnene vaskes med 2 ml metanol
5. Kolonnene kondisjoneres med 2 ml vann
6. Prøvene appliseres på fuktige kolonner
7. Kolonnene vaskes med 2 ml vann
8. Prøvene elueres med 2 ml metanol
9. Dampes inn på heteblokk, 45-55°C, under strøm av nitrogen
10. Residuet løses i 100 µl metanol og 1 ml 0,03 M fosfatbuffer pH 6,5-7

Enzymatisk hydrolyse:

11. + 30 µl β-glukuronidase per 2,5 ml urin (Boehringer Mannheim)
12. Prøven inkuberes i varmeskap ved 50-55°C i ca 1 time, eventuelt natten over ved 35-39°C

Væske-væske ekstraksjon:

13. Prøvene avkjøles til romtemperatur, pH justeres til 9,5-9,8 med 0,2 ml 3 M trisbuffer. pH sjekkes.
14. + 5 ml t-butylmetyler
15. Prøvene ristes ca. 2 min for hånd eller 10 min på ristemaskin
16. Sentrifuges ca. 10 min ved 1200-1500 rpm
17. Vannfasen fryses i aceton/tørribad og organisk fase helles over i rene 10 ml slipglass som er merket

Derivatisering for GC-MS:

18. Organisk fase dampes inn på heteblokk, 45-55°C, under en strøm av nitrogen.
19. Innsiden av glassveggene skylles ned med ca 0,2 ml metanol
20. Prøvene dampes inn til tørrhet. OBS! Må være helt tørt!
21. + 40 µl derivatiseringsreagens. Bruksløsning: MSTFA:NH<sub>4</sub>I:etantiol 1000:2:6 (v:w:v)
22. Derivateres på heteblokk ved 65-75°C i ca 20 min
23. Prøvene overføres til 2 ml autosamplerglass med insert

Figur 4 Flytskjema for prøveoppbeidelsen

## 2.6. Analyseparametre

### 2.6.1. Instrument: GC-MS

#### GC-parametre

Kolonne: J&W Ultra 1 kapillærkolonne, kryssbundet  
100 % metylsilikon, 17 m x 0,2 mm, filmtykkelse 0,11 µm

Injeksjonsvolum: 1 µl

Splitt: 1:20

Bæregass: Helium, 0,9 ml/min

Temperaturprogrammet som ble brukt var som følger:  
Starttemperatur 180°C, varmes så opp med en hastighet på 3,3 °C/min til 231°C.  
Deretter ble oppvarmingshastigheten økt til 30°C/min, til ovnen hadde en temperatur på 310°C. Temperaturen ble holdt konstant der i 2 min.

#### MS-opptaksparametre

Ionisering: Elektronionisasjon

For å oppnå høy følsomhet, ble instrumentet stilt inn på SIM-monitorering. Ionene som skulle måles ble delt inn i grupper, og instrumentet ble programmert til å måle på massene i de ulike gruppene i bestemte tidsintervaller. Tabell 12 viser gruppene, hvilken retensjonstid de hadde og hvilke masser de ulike gruppene målte på.

Tabell 12 Ioneprogram for MS

<b>Gruppe 1 (5,00 min – 11,69 min)</b>	<b>Gruppe 2 (11,70 min – 14,69 min)</b>	<b>Gruppe 3 (14,70 min – 17,00 min)</b>
241,10	275,20	117,10
244,10	290,20	255,20
246,10	399,30	301,20
256,20	414,30	435,30
272,20	417,30	449,30
419,30	419,30	
434,30	432,30	
438,30	434,30	
439,30	435,30	
	437,30	
	522,40	

## 2.7. Identifikasjon og kvantifisering

Identifikasjonen av stoffene foregår ved at retensjonstiden og forholdet mellom de ulike ioneintensitetene blir sammenlignet med en positiv kontrollprøve.

Konsentrasjonen av stoffer i en urinprøve vil avhenge av urinens spesifikke vekt. Har det vært et stort væskeinntak, vil urinen være mer fortynnet enn om det er et normalt væskeinntak. Dette henspeiler seg i urinens spesifikke vekt. En spesifikk vekt på 1,020 er definert som normalt. Et utvalg av uriner vil fordele seg rundt denne verdien. Når det blir korrigert for spesifikk vekt, vil de med lav spesifikk vekt få en konsentrasjon som ligger noe høyere enn den målte verdien og prøver med høy spesifikk vekt noe lavere konsentrasjoner enn den målte verdien.

For at prøven på en best mulig måte kunne sammenliknes, ble det målt spesifikk vekt for alle prøvene og de resultatene som blir vist i oppgaven korrigert for spesifikk vekt.

Det ble korrigert for spesifikk vekt etter denne formelen:

$$\text{Konsentrasjon}_{\text{korrigert}} = (1,020 - 1) / (\text{Spesifikk vekt} - 1) \times \text{konsentrasjon}_{\text{ukorrigert}}$$

[33]

Kvantifiseringen ble utført ved å sammenlikne arealene for stoffene i prøven med den lagde kalibreringskurven, konsentrasjonene til de ulike stoffene i kalibreringskurven er vist i tabell 11.

## 2.8. Validering

En metode valideres for å kontrollere at metoden er egnet til det formålet den skal brukes til. Det stilles krav til selektivitet/spesifisitet, linearitet, presisjon (repeterbarhet og reproduserbarhet), nøyaktighet (accuracy), overdraging (carry over), gjenvinning (recovery), deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ).

Valideringsmetoden som ble brukt er en etablert valideringsmetode ved Seksjon for dopinganalyse. Den går over 3 dager, og i tillegg til å bestemme variasjonen innen hver dag (intra-assay) ble også variasjonen mellom hver dag bestemt (inter-assay).

### 2.8.1. Selektivitet/Spesifisitet

Selektivitet/spesifisitet angir metodens evne til å kunne bestemme analytten uten interferens fra andre komponenter som er tilstede i prøven. [6]

For å bestemme denne ble 5 forskjellige blankprøver analysert, for å demonstrere at det ikke er andre interfererende forbindelser. Dette ble demonstrert både med hensyn på de forskjellige analyttene og deres internstandarder.

### 2.8.2. Linearitet

Lineariteten angir området hvor responsen til analytten er proporsjonal med konsentrasjonen. [6]

Den ble bestemt ved å etablere en standardkurve med 5 punkter. Denne standardkurven skal dekke hele området som det forventes å finne de ulike analyttene i. Konsentrasjonene av de forskjellige stoffene brukt i standardkurven er vist i tabell 13.

Tabell 13 Standardkurven for de ulike stoffene.

Stoff	1 ng/ml	2 ng/ml	3 Ng/ml	4 ng/ml	5 Ng/ml
5 $\alpha$ -androstandiol	10	100	300	700	1000
5 $\beta$ -androstandiol	10	100	300	700	1000
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	8	80	240	560	800
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	10	100	300	700	1000
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	15	150	450	1050	1500
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	10	100	300	700	1000
Androsteron	100	1000	3000	7000	10000
DHEA	2	20	60	140	200
DHT	2	20	60	140	200
Epitestosteron	2	20	60	140	200
Etiokolanolon	100	1000	3000	7000	10000
Pregnandiol	10	100	300	700	1000
Pregnantriol	2	20	60	140	200
Testosteron	2	20	60	140	200
Østron	2	20	60	140	200

### 2.8.3. Presisjon og nøyaktighet

Presisjon angir spredningen av analyseresultatene og blir vanligvis angitt i relativt standardavvik (CV %).

Nøyaktighet angir hvor nært opp mot den "sanne" verdien analyseresultatene er og blir vanligvis angitt i prosentvis avvik fra sann verdi. [6]

Til bestemmelse av presisjon og nøyaktighet ble det laget kontrollprøver med 3 forskjellige konsentrasjoner (lav, middels og høy). Konsentrasjonene er angitt i tabell 14. Intra-assay presisjon og nøyaktighet ble målt ved å injisere 5 paralleller av hver konsentrasjon på dag en og sammenligne disse.

Inter-assay presisjon og nøyaktighet ble målt ved å også injisere 5 paralleller av hver konsentrasjon hver dag og sammenligne resultatene.

Tabell 14 Konsentrasjon av kontrollprøvene

Stoff	Lav konsentrasjon (ng/ml)	Middels konsentrasjon (ng/ml)	Høy konsentrasjon (ng/ml)
5 $\alpha$ -androstandiol	10	180	560
5 $\alpha$ -androstandiol	10	180	560
6 $\beta$ -OH-androsteron	8	144	432
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	180	560
11 $\beta$ -OH-androsteron	15	270	810
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	180	560
Androsteron	100	1800	5600
DHEA	2	36	112
DHT	2	36	112
Epitestosteron	2	36	112
Etikolanolon	100	1800	5600
Pregnandiol	10	180	560
Pregnantriol	2	36	112
Testosteron	2	36	112
Østron	2	36	112

#### 2.8.4. Gjenvinning (recovery)

Gjenvinning angir hvor mye av stoffet, i prosent, som gjenfinnes i den opparbeidede prøven. Den vil da gi et estimat over hvor mye av stoffmengden som går tapt under prøveoppbeidelsen.

Gjenvinningen ble målt ved at blankprøver ble tilsatt samme mengde standarder og internstandarder som kontrollprøvene etter at prøveoppbeidelsen er ferdig, men før siste inndamping. Resultatet fra disse prøvene ble sammenlignet med kontrollprøvene som fikk tilsatt standardene før prøveoppbeidelsen, for å vise hvor mye stoff som gikk tapt underveis.

#### 2.8.5. LOD og LOQ

Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) angir henholdsvis den laveste konsentrasjonen som med sikkerhet kan detekteres og kvantifiseres med metoden. [6]

LOD og LOQ ble estimert fra standardavviket som ble beregnet på grunnlag av 4 av de 5 parallellene av den laveste kontrollprøven. En prøve ble her utelukket p.g.a. åpenbar kontaminering i prøveoppbeidelsen. LOD uttrykkes som 3 ganger dette standardavviket og LOQ uttrykkes som 10 ganger dette standardavviket.



## 2.9. Identifikasjon og kvantifisering

For identifikasjon av stoffet ble to ioner valgt ut for hvert stoff. Begge disse må være tilstede ved riktig tid for at stoffet skal være identifisert. I tillegg skal forholdet mellom disse verdiene være det samme som i kontrollprøven.

For kvantifisering av stoffene ble det mest spesifikke ionet valgt ut. Ved kvantifisering må dette ionet minst ha et signal/støyforhold på 10:1.

Tabell 15 viser identifikasjonsionene og kvantifiseringsionene samt retensjonstiden til de forskjellige stoffene.

Tabell 15 Identifikasjons- og kvantifiseringsioner og retensjonstider til stoffene

Stoff	Identifikasjonsioner, kvantifiseringsionet er understreket	Retensjonstid (min)
5 $\alpha$ -androstandiol	<u>241</u> , 256	11,14
5 $\beta$ -androstandiol	<u>241</u> , 256	11,26
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	<u>522</u> , 417	12,98
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	<u>522</u> , 417	13,13
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	<u>522</u> , 417	13,63
11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	<u>522</u> , 417	13,84
Androsteron	<u>434</u> , 419	10,79
DHEA	<u>432</u> , 417	12,06
DHT	<u>434</u> , 419	12,75
Epitestosteron	<u>432</u> , 417	12,54
Etiokolanolon	<u>434</u> , 419	10,97
Pregnandiol	<u>449</u> , 417	16,05
Pregnantriol	<u>435</u> , 255	16,88
Testosteron	<u>432</u> , 417	13,34
Østron	<u>414</u> , 399	12,80



## 3. Resultater

### 3.1. Validering

#### 3.1.1. Linearitet

Tabell 16 viser den dårligste korrelasjonskoeffisienten oppnådd for de forskjellige stoffene.

Tabell 16 Korrelasjonskoeffisient til stoffene

Stoff	Korrelasjonskoeffisient
5 $\alpha$ -androstadiol	0,993
5 $\beta$ -androstadiol	0,980
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	0,919
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	0,920
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	0,916
11 $\beta$ - hydroksyetiokolanolon	0,916
Androsteron	0,994
DHEA	0,885
DHT	0,934
Epitestosteron	0,996
Etiokolanolon	0,980
Pregnandiol	0,899
Pregnantriol	0,844
Testosteron	0,995
Østron	0,898

#### 3.1.2. Presisjon og nøyaktighet

Under valideringen ble det beregnet intra- og inter-assay presisjon og nøyaktighet. Intra-assay angir presisjon og nøyaktighet innenfor en av valideringsdagene. Inter-assay angir presisjon og nøyaktighet for alle 3 dagene.

Presisjon angis som relativt standardavvik (CV %), og nøyaktighet angis som prosentvis avvik fra "sann" verdi.

Kravet for godkjenning av presisjon varierer for hvilket konsentrasjonsområdet det analyseres i. Største akseptable standardavvik i området som er aktuelt her, er ved Seksjon for dopinganalyse satt til 30 %. Når det gjelder nøyaktighet, bør det relative avviket ikke overskride 25 %.

Tabell 17 viser presisjon og nøyaktighet for de ulike stoffene i de ulike kontrollkonsentrasjonene.

Tabell 17 Presisjon og nøyaktighet oppnådd for stoffene

Stoff	Konsentrasjon ng/ml	Intra-assay		n	Inter-assay		n
		Presisjon (%)	Nøyaktighet (%)		Presisjon (%)	Nøyaktighet (%)	
5 $\alpha$ -androstandiol	10	14	-14	4	13	-12	12
	180	1,5	6,1	5	20	23	15
	560	0,89	0,71	5	2,2	-2,0	15
5 $\beta$ -androstandiol	10	3,6	8,3	4	8,8	-0,01	12
	180	1,8	6,9	5	20	21	15
	560	0,87	5,6	5	4,1	0,13	15
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	8	11	-17,	4	18	-14	12
	144	8,5	6,1	5	24	26	15
	432	17	-5,8	5	14	0,76	14
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	10	14,1	-26	4	20	-18	12
	180	8,7	2,8	5	26	25	15
	560	13	-12	5	15	-3,0	14
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	15	14	-28	4	17	-18	12
	270	11	1,5	5	24	21	15
	810	12	-12	5	14	-2,9	14
11 $\beta$ - hydroksyetiokolanolon	10	12	-14	4	16	-24	12
	180	16	12	5	24	19	15
	560	11	1,6	5	13	-6,2	14
Androsteron	100	5,8	29	4	6,3	23	12
	1800	1,6	16	5	20	33	15
	5600	1,0	8,8	5	2,8	5,2	15
DHEA	2	15	-32	4	22	-26	11
	36	14	-6,3	5	23	9,9	15
	112	18	-16	5	17	-9,3	14
DHT	2	9,8	15	4	15	3,0	11
	36	13	11	5	24	19	15
	112	12	2,7	5	14	-4,8	14
Epitestosteron	2	4,7	18	4	6,1	17	11
	36	3,7	15	5	22	24	15
	112	0,65	0,04	5	3,1	0,72	15
Etiokolanolon	100	6,5	6,1	4	9,6	8,9	12
	1800	1,9	2,9	5	21	29	15
	5600	0,88	0,07	5	5,6	5,6	15
Pregnandiol	10	18	12	4	34	-20	12
	180	8,6	9,3	5	21	8,8	15
	560	13,8	4,5	5	41	-30	14
Pregnantriol	2	13	-12	4	34	27	10
	36	13	-0,70	5	23	20	15
	112	16	-14	5	21	-2,1	14
Testosteron	2	4,8	21	4	5,7	20	12
	36	2,0	7,4	5	21	27	15
	112	1,2	4,8	5	2,1	2,5	15
Østron	2	13	4,1	4	20	-3,2	11
	36	14	24	5	19	27	15
	112	18	4,3	5	16	-1,1	14

### 3.1.3. Gjenvinning (recovery)

Tabell 18 viser gjennomsnittlig gjenvinning til stoffene.

Tabell 18 Gjennomsnittlig gjenvinning

Stoff	Gjenvinning (%)
5 $\alpha$ -androstandiol	94,6
5 $\beta$ -androstandiol	90,6
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	90,4
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	86,2
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	92,6
11 $\beta$ - hydroksyetiokolanolon	91,7
Androsteron	89,7
DHEA	90,0
DHT	103,8
Epitestosteron	103,6
Etiokolanolon	89,9
Pregnandiol	67,8
Pregnantriol	69,1
Testosteron	102,7
Østron	92,3

Gjenvinningen bør ligge i området 80-100 %. Men for screeningmetoder, sånn som denne metoden, kan lavere gjenvinning godkjennes fordi metoden omfatter flere ulike stoffer, og kan dermed ikke være optimal for alle analyttene.

### 3.1.4. LOD og LOQ

Tabell 19 viser LOD og LOQ for de forskjellige stoffene. LOD uttrykkes som 3 ganger standardavviket for de laveste kontrollprøvene, og LOQ uttrykkes som 10 ganger standardavviket for disse prøvene.

Tabell 19 LOD og LOQ for stoffene

Stoff	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
5 $\alpha$ -androstandiol	1,9	6,2
5 $\beta$ -androstandiol	2,2	7,2
6 $\beta$ -hydroksyandrosteron	1,9	6,2
6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon	1,8	6,1
11 $\beta$ -hydroksyandrosteron	5,7	19
11 $\beta$ - hydroksyetiokolanolon	1,9	6,4
Androsteron	22	74
DHEA	0,15	0,48
DHT	0,85	2,8
Epitestosteron	0,46	1,5
Etiokolanolon	25	84
Pregnandiol	2,9	9,7
Pregnantriol	12	41
Testosteron	0,49	1,6
Østron	0,53	1,8

## 3.2. Fremstilling av resultatene fra prøvene

Resultatene blir fremstilt i et boks-plot, da dette ga den mest hensiktsmessige fremstillingen av dette tallmaterialet.

Boksen i boks-plottet viser det interkvartile området, hvor 50 % av alle verdiene ligger i. Streken i boksen viser medianen av de målte verdien, mens strekene som strekker seg utenfor boksen viser 1,5 ganger det interkvartile området. Alle verdier som kommer utenfor disse områdene vil vises som enkeltverdier, markert med stjerne, i plottet.

### 3.3. Prøvene fra Danmark

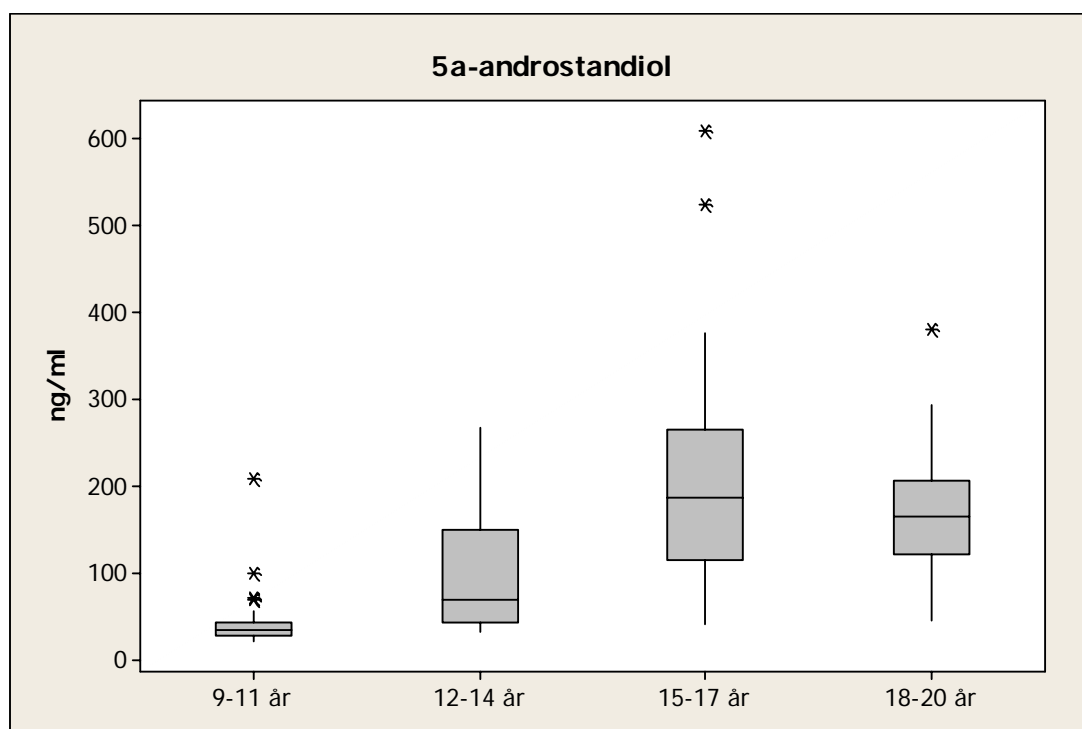
Figur 5 til 19 viser resultatene for hvert stoff i prøvene fra Danmark. Antall prøver i de ulike gruppene er;

- 9-11 år: 35 prøver

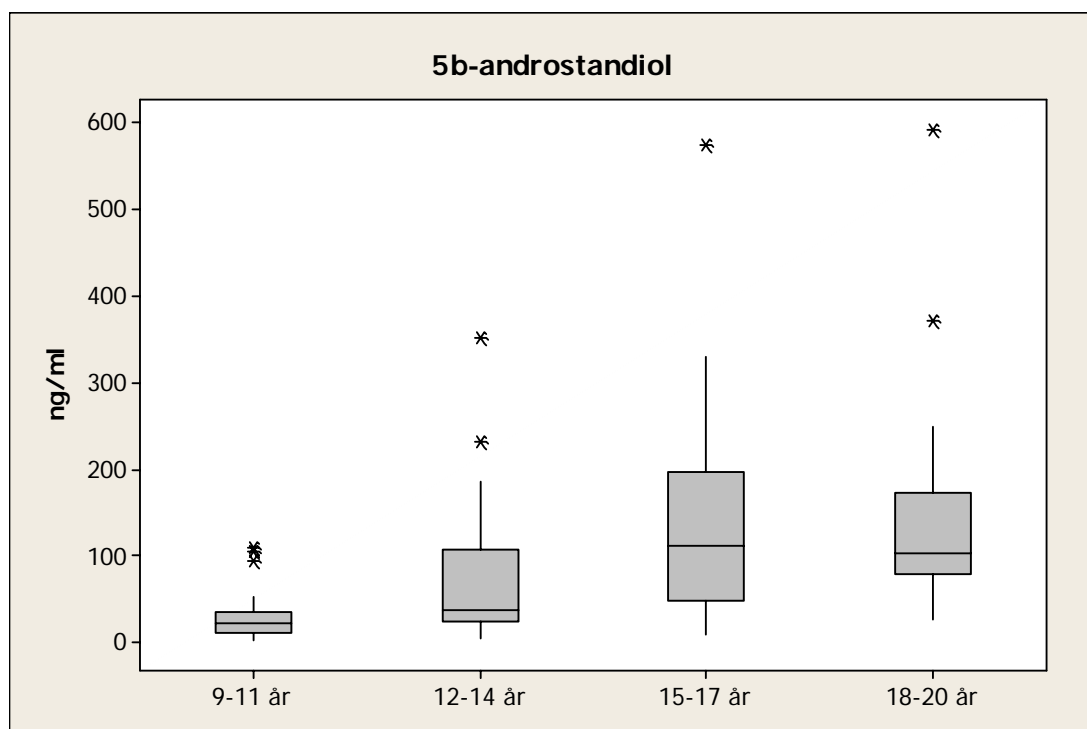
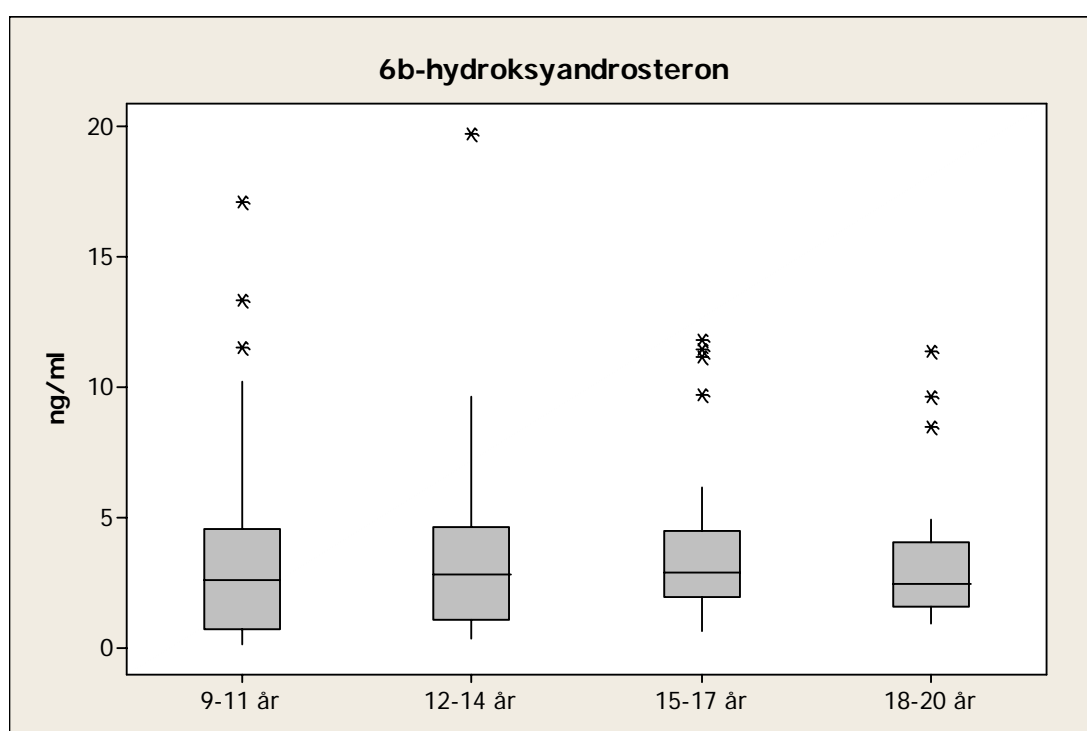
- 12-14 år: 35 prøver

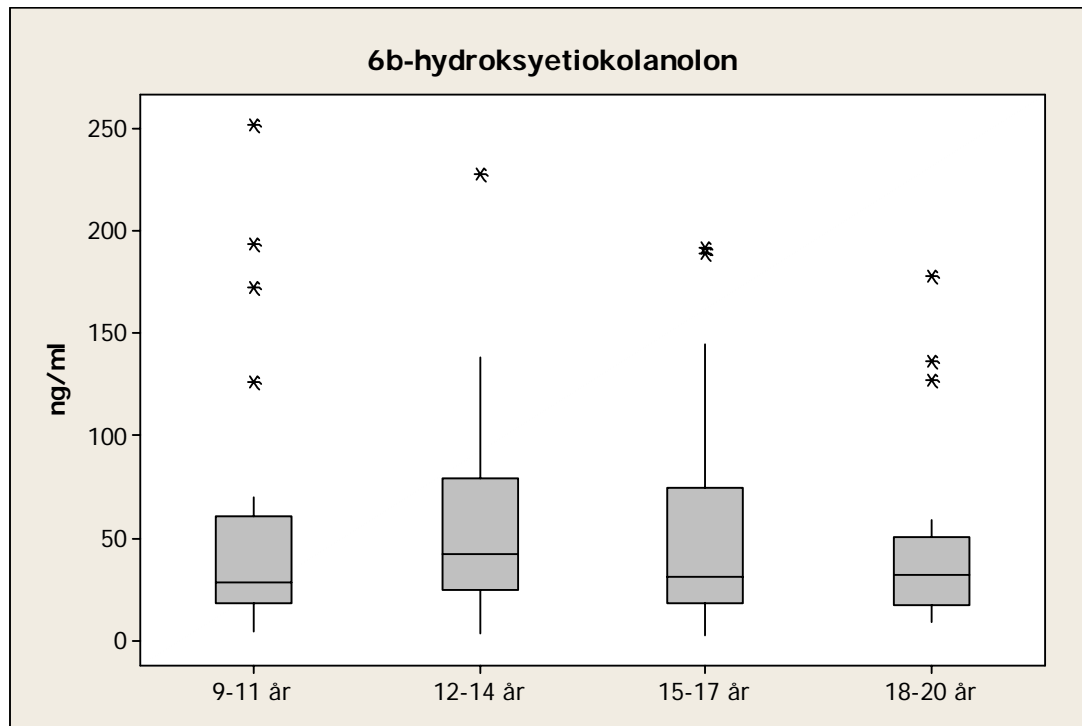
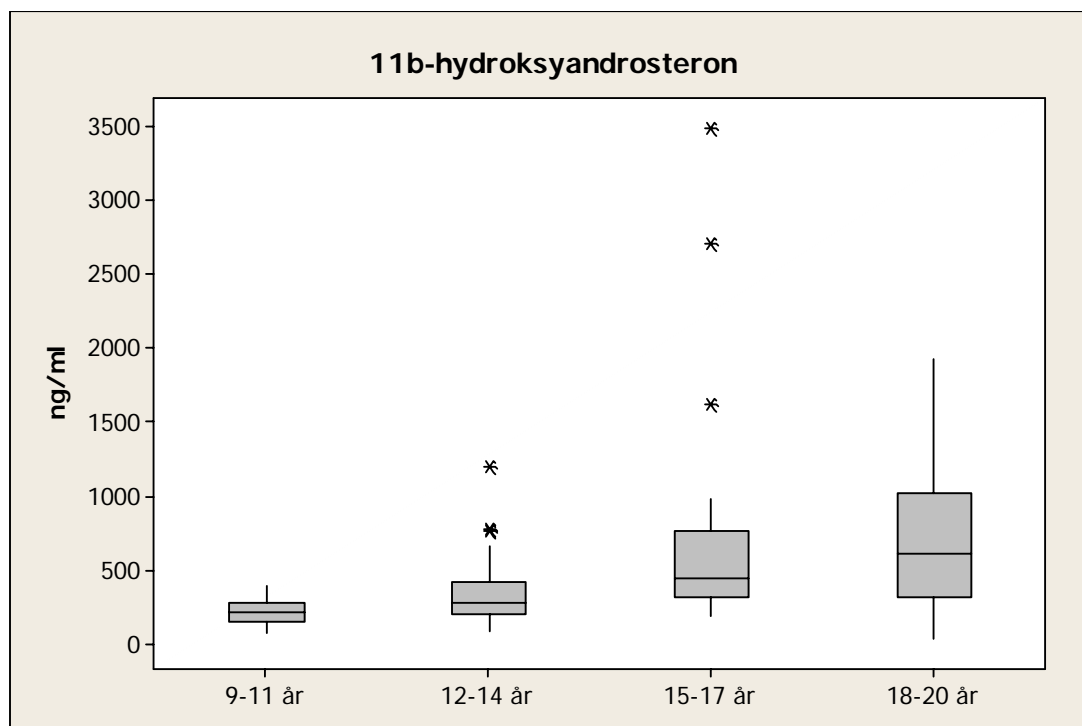
- 15-17 år: 33 prøver

- 18-20 år: 22 prøver.

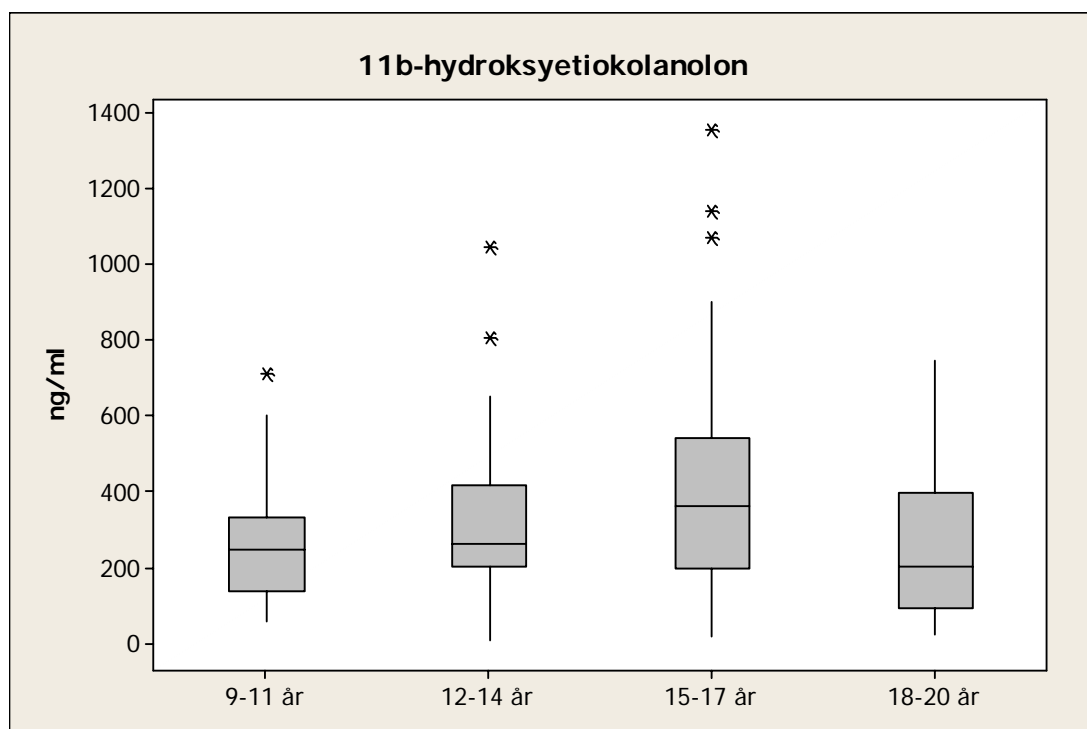
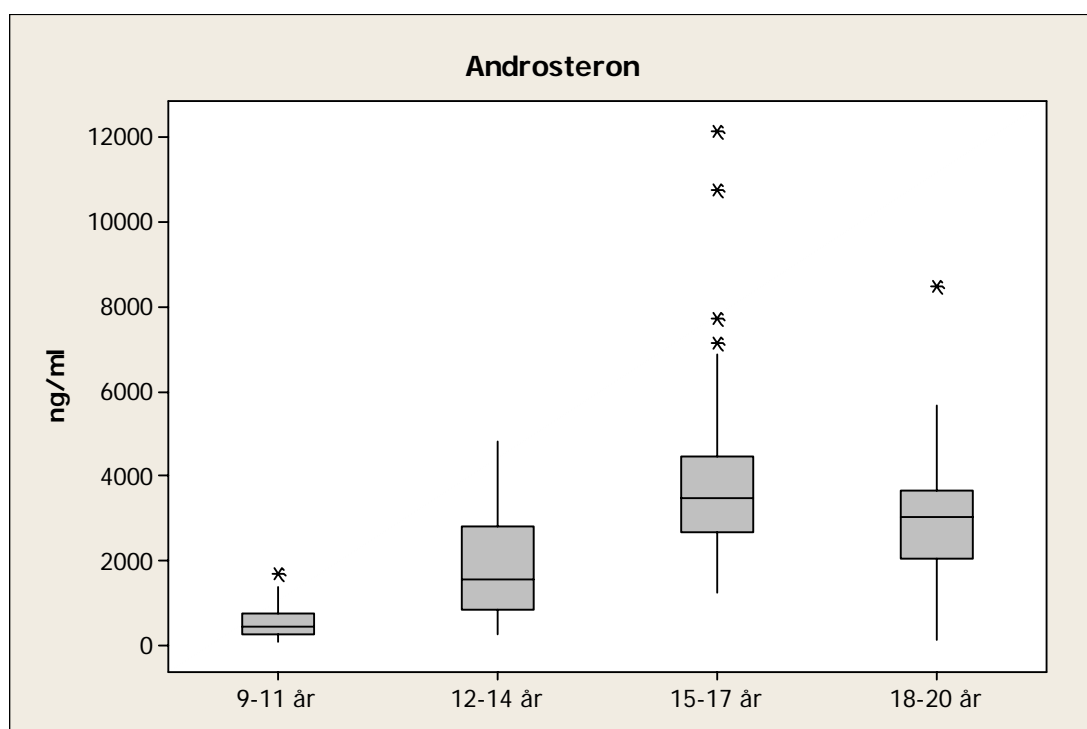


Figur 5 Resultatene for 5α-androstandiol

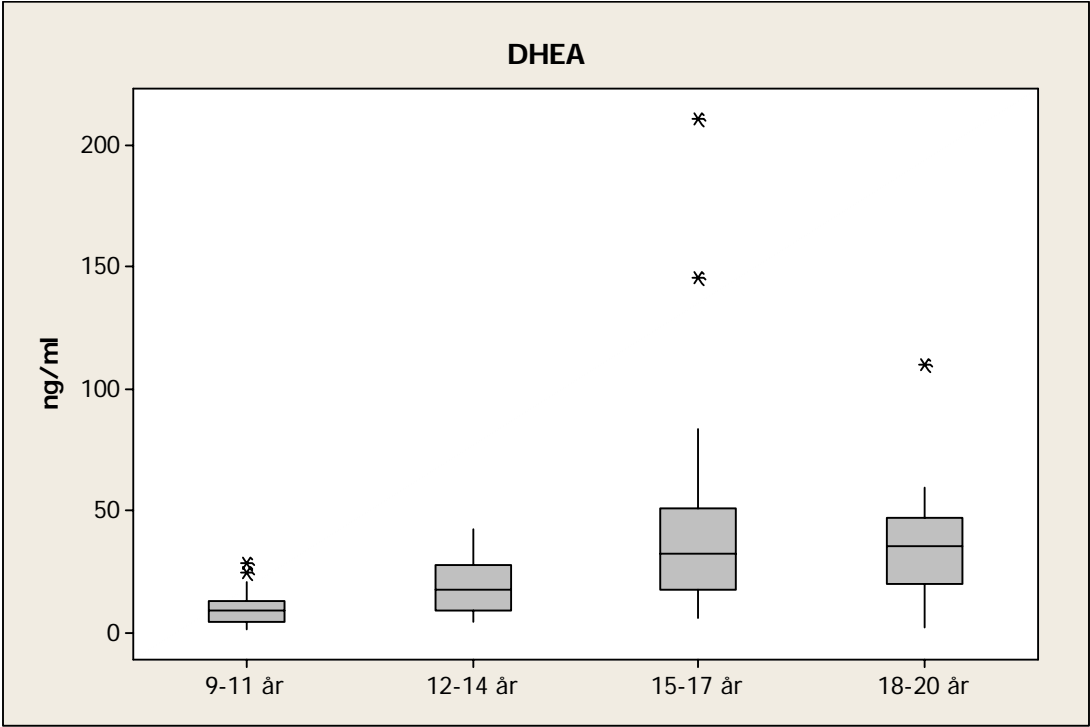
Figur 6 Resultatene for 5 $\beta$ -androstandiolFigur 7 Resultatene for 6 $\beta$ -hydroksyandrosteron

Figur 8 Resultatene for 6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolonFigur 9 Resultatene for 11 $\beta$ -hydroksyandrosteron

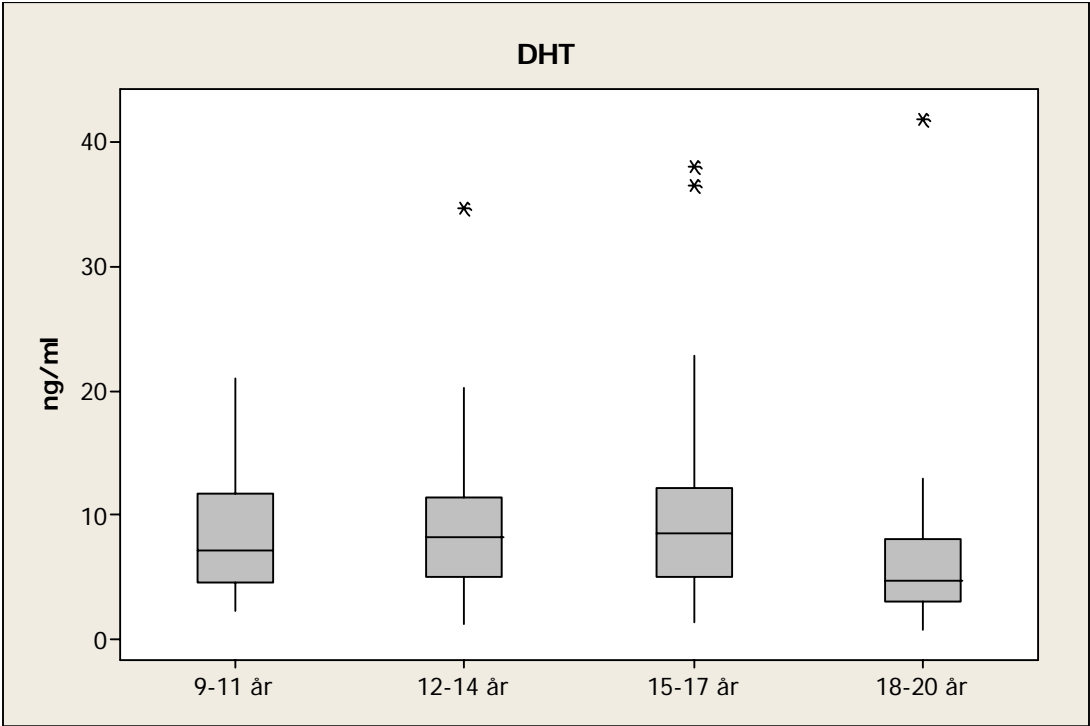


Figur 10 Resultatene for 11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon

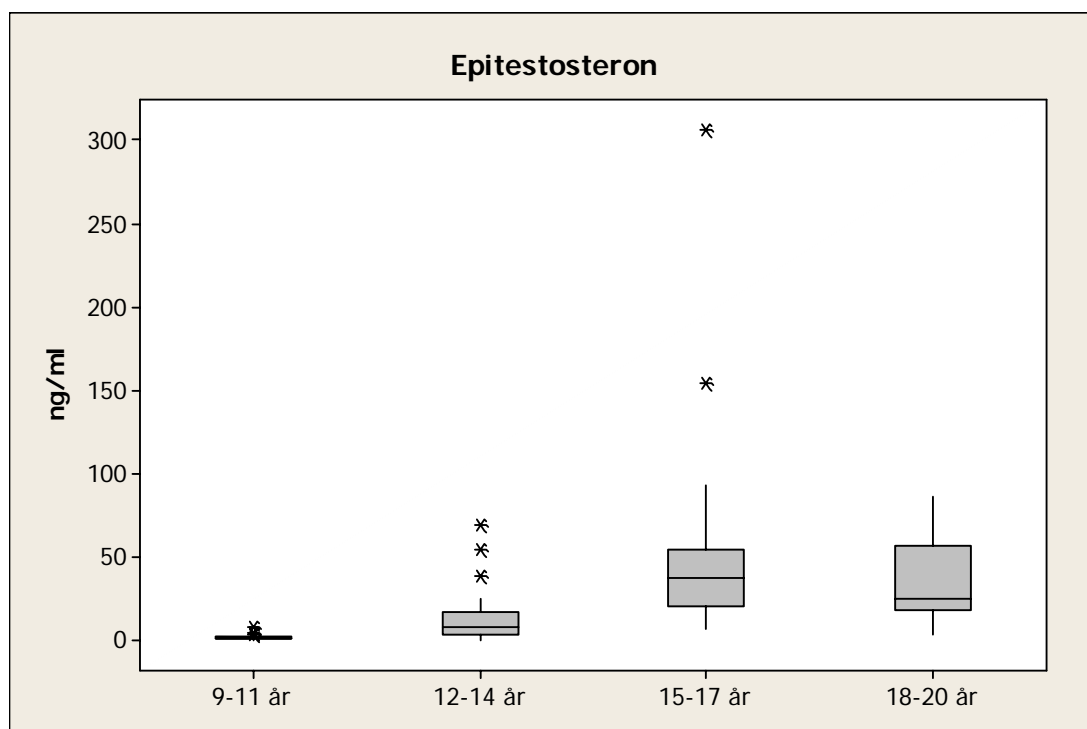
Figur 11 Resultatene for androsteron



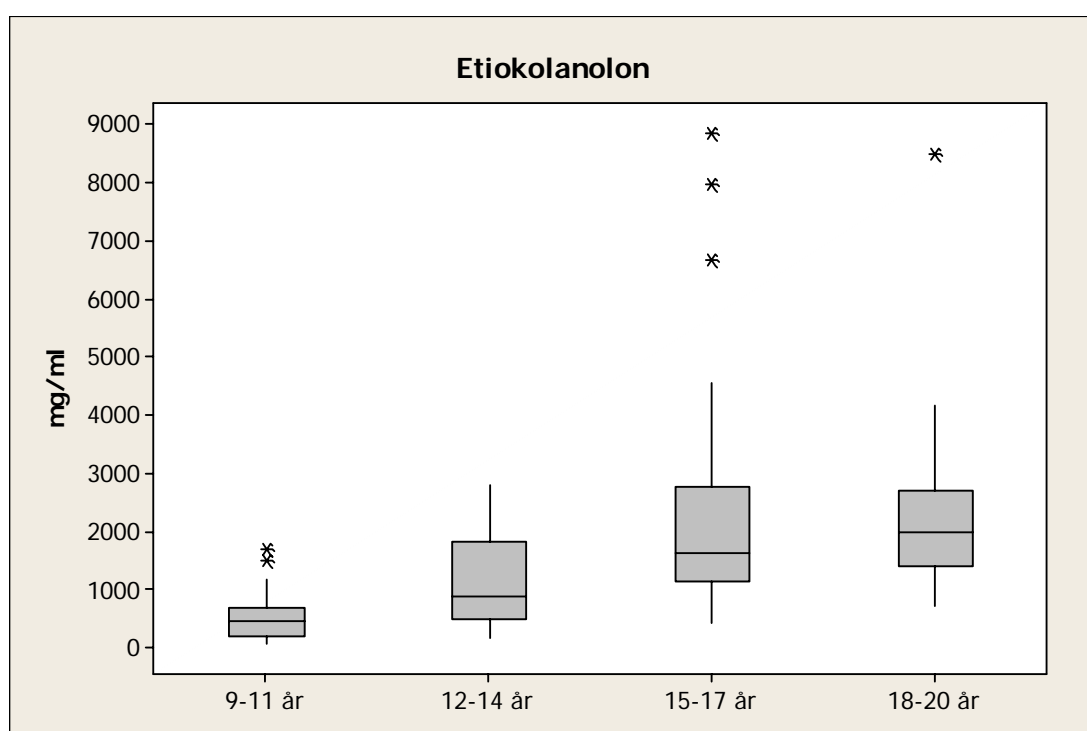
Figur 12 Resultatene for DHEA



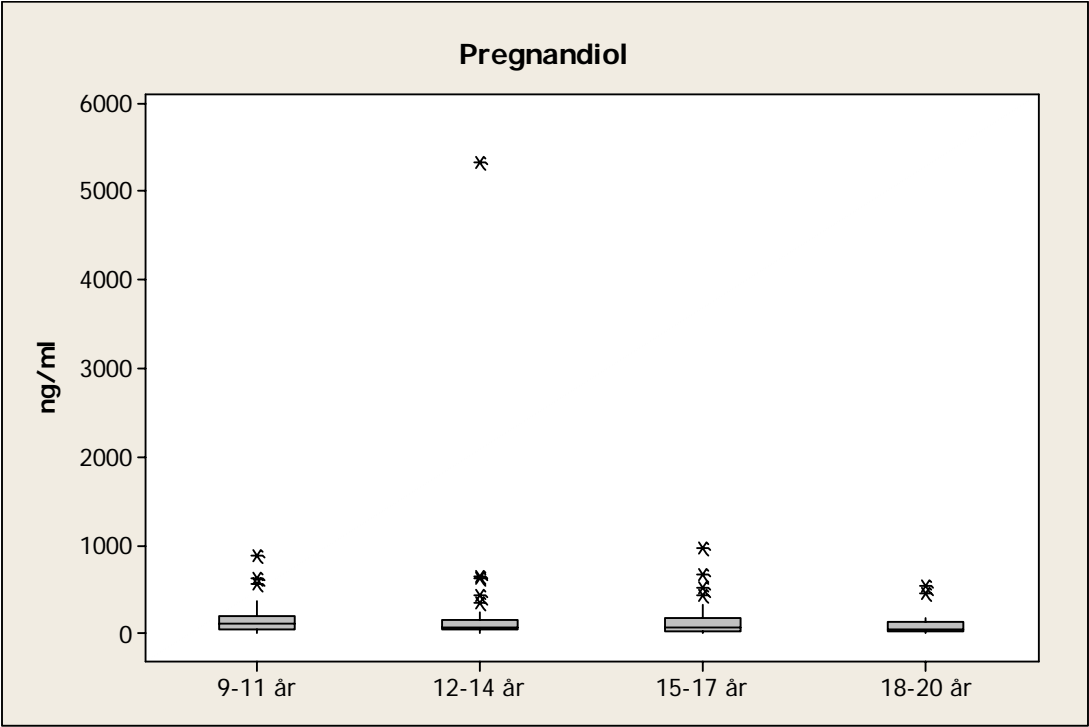
Figur 13 Resultatene for DHT



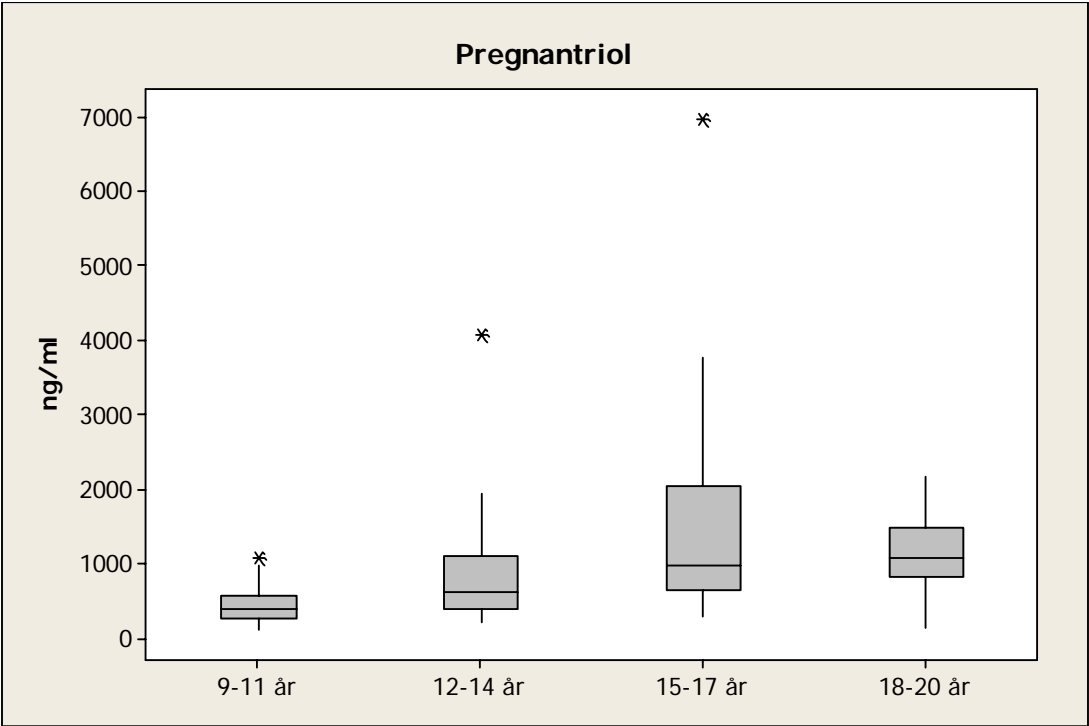
Figur 14 Resultatene for epitestosteron



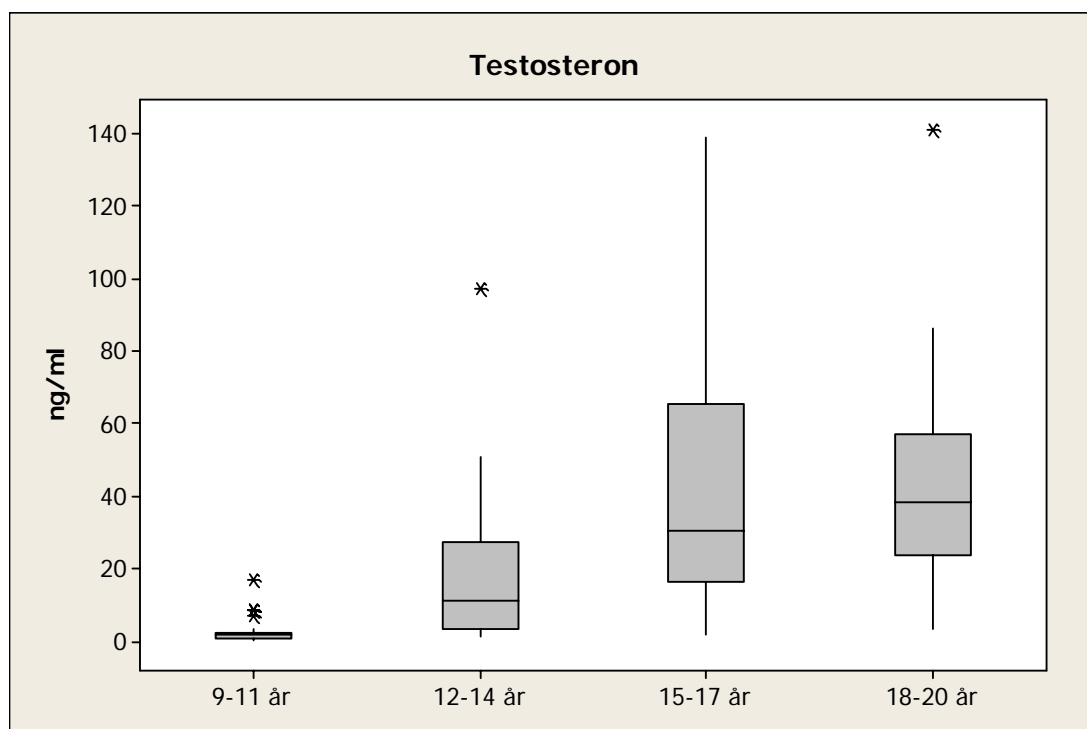
Figur 15 Resultatene for etiokolanolon



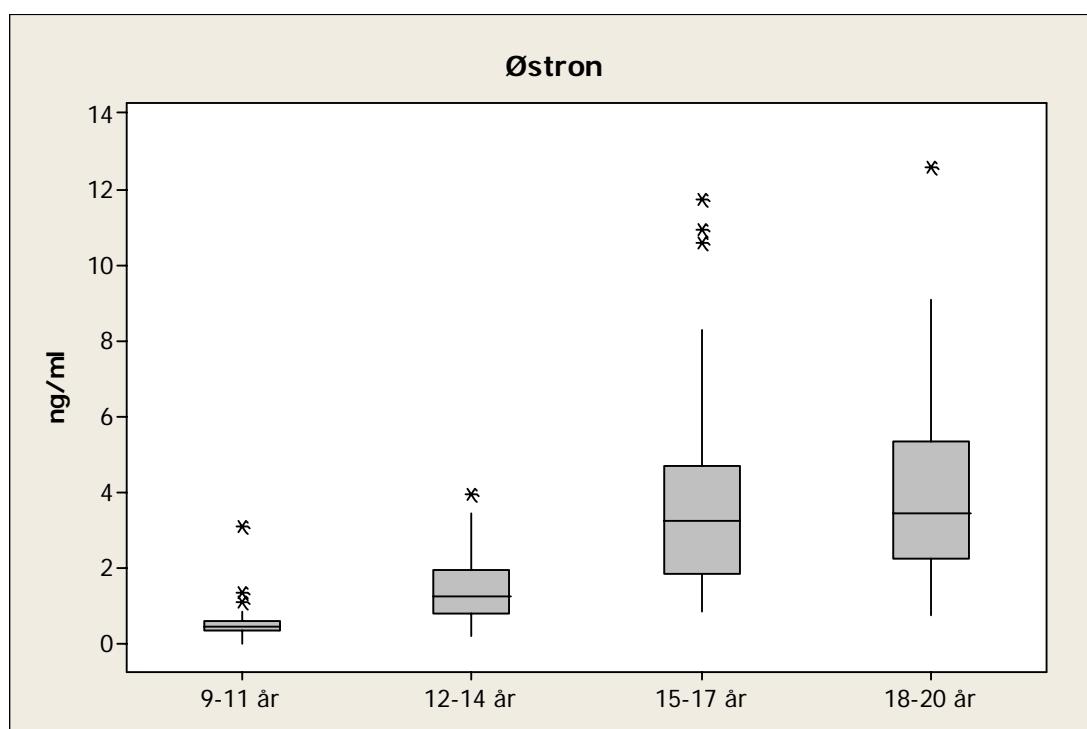
Figur 16 Resultatene for pregnandiol



Figur 17 Resultatene for pregnantriol



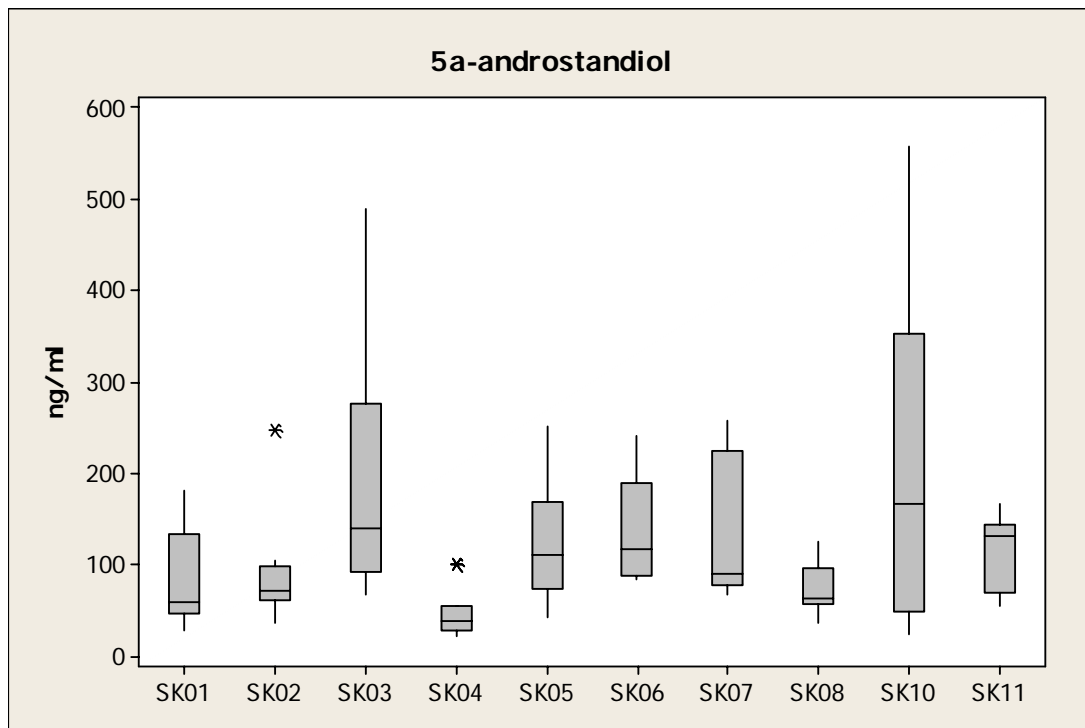
Figur 18 Resultatene for testosteron



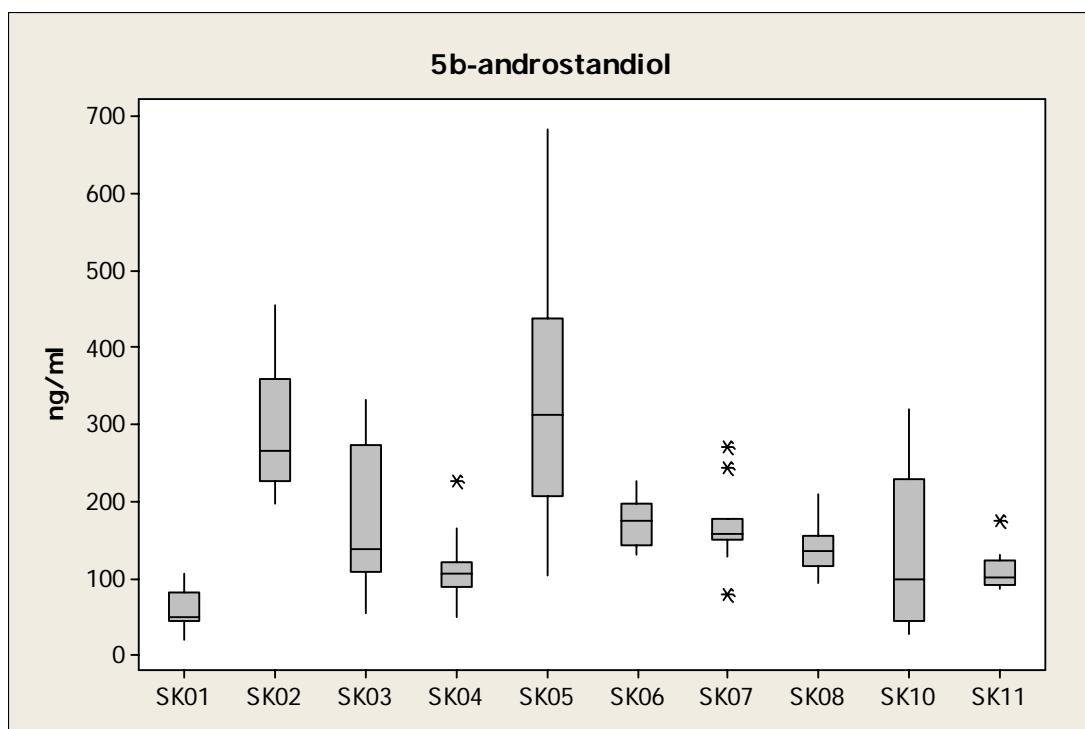
Figur 19 Resultatene for østron

### 3.4. Prøvene fra fotballspillerne

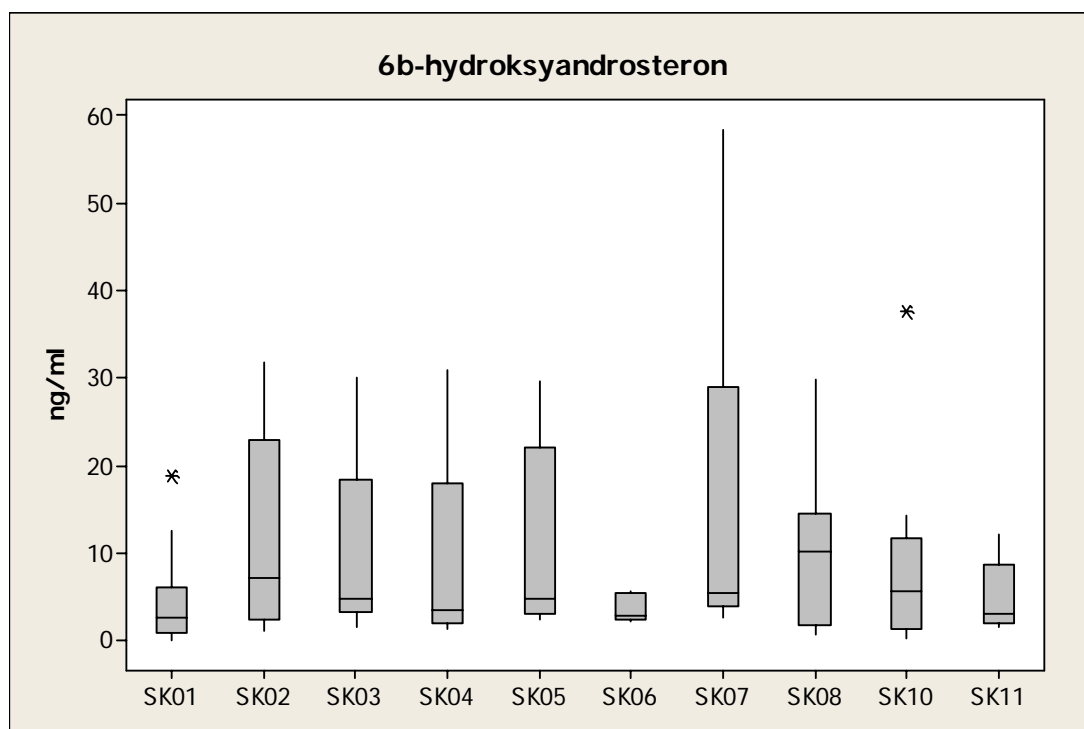
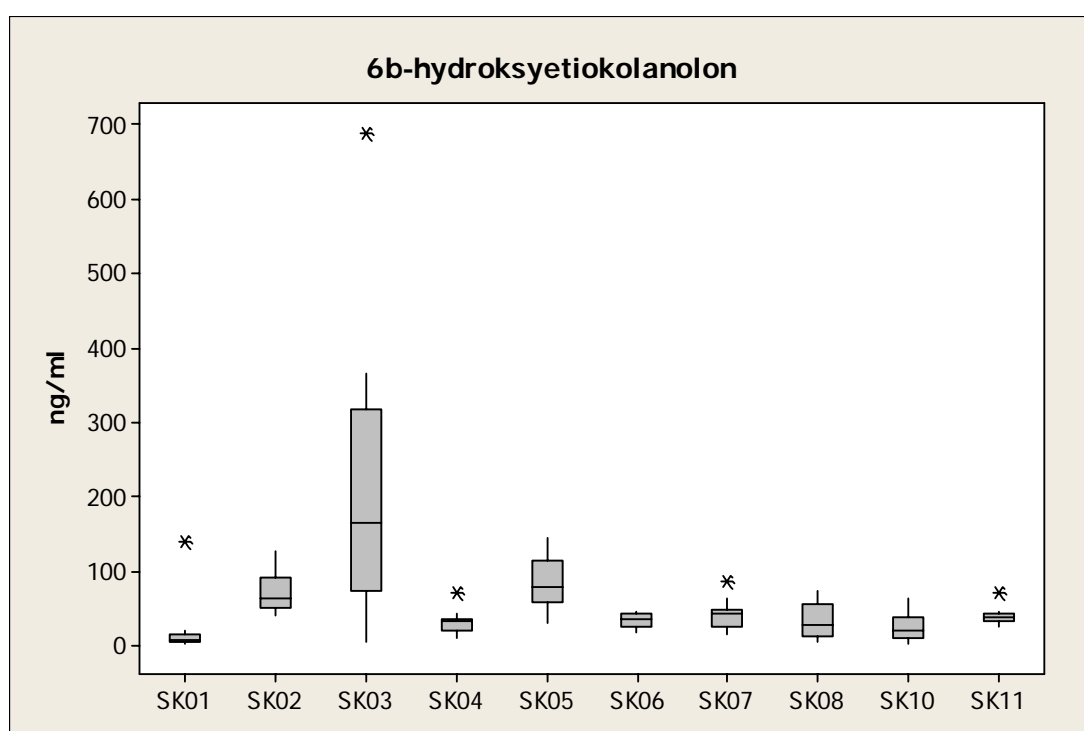
Figur 20 til figur 34 viser resultatene til fotballspillerne. Det ble i gjennomsnitt samlet inn 9 prøver per fotballspiller.

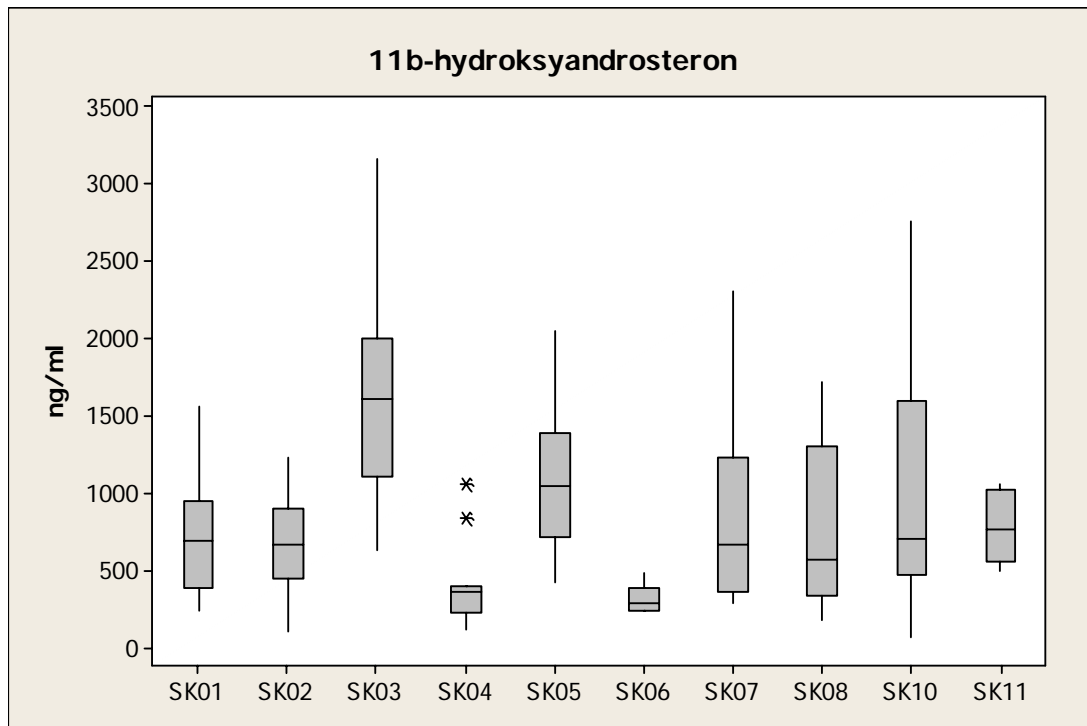


Figur 20 Resultatene for 5α-androstandiol

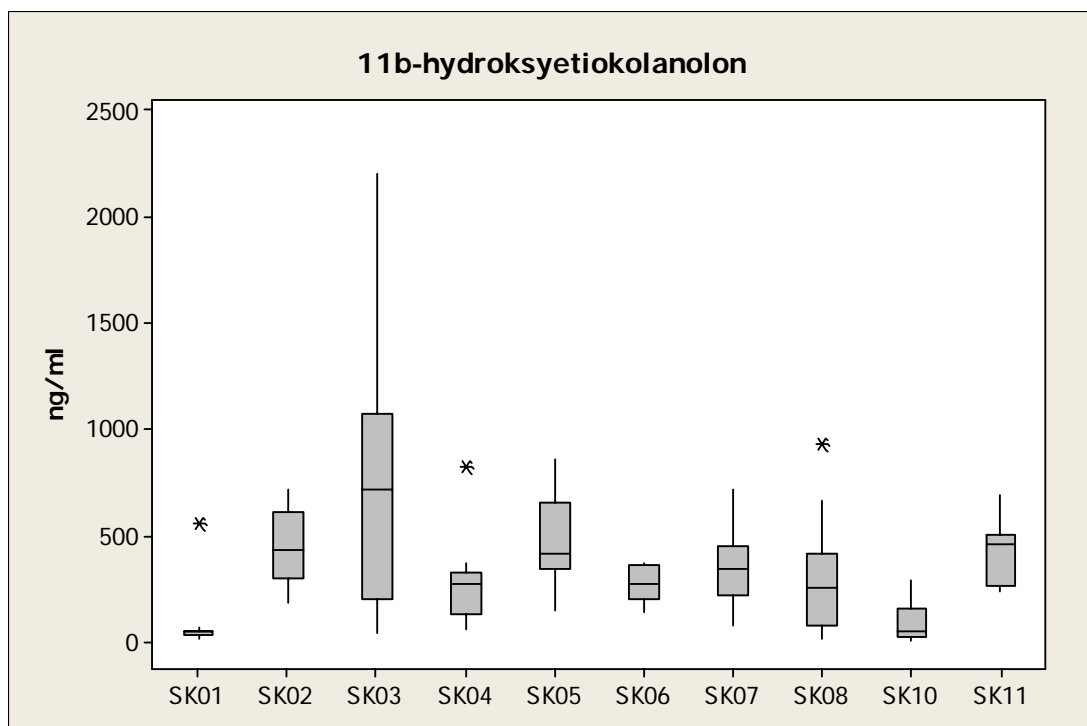


Figur 21 Resultatene for 5β-androstandiol

Figur 22 Resultatene for 6 $\beta$ -hydroksyandrosteronFigur 23 Resultatene for 6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon

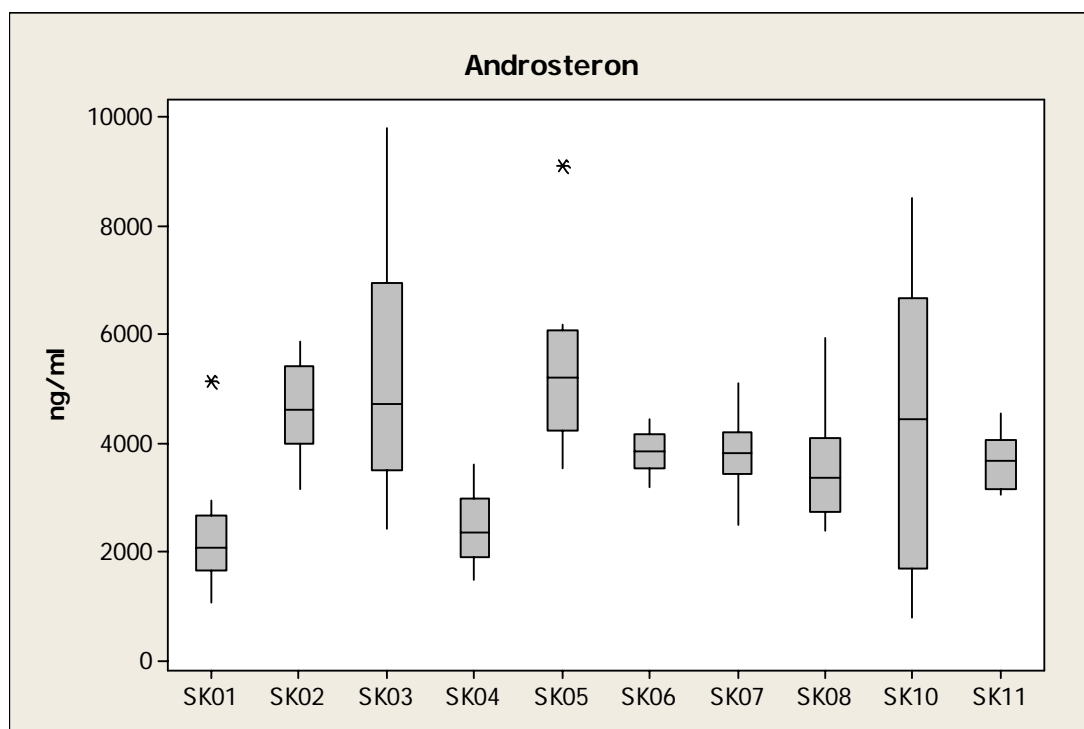


Figur 24 Resultatene for 11 $\beta$ -hydroksyandrosteron

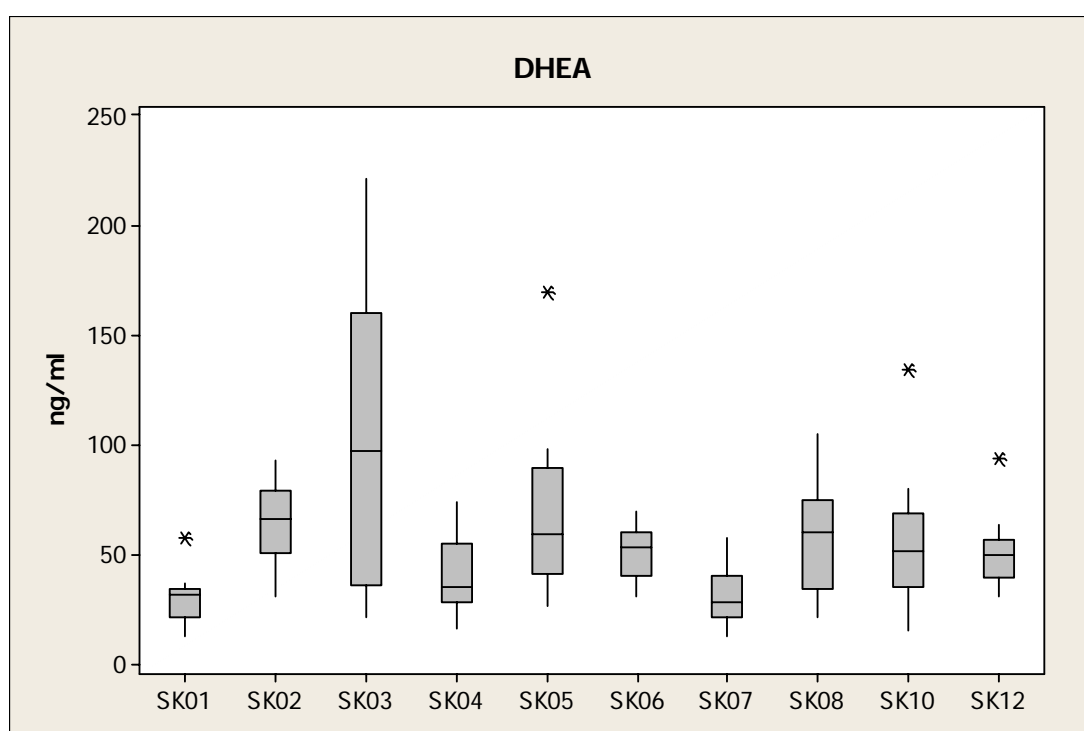


Figur 25 Resultatene for 11 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon

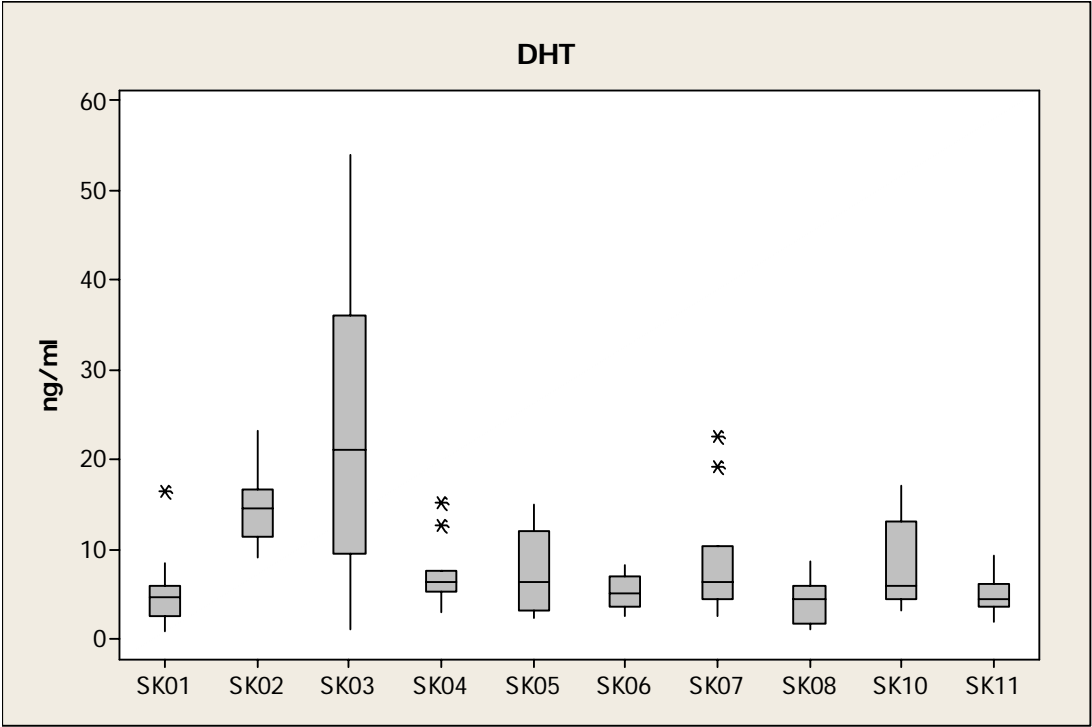




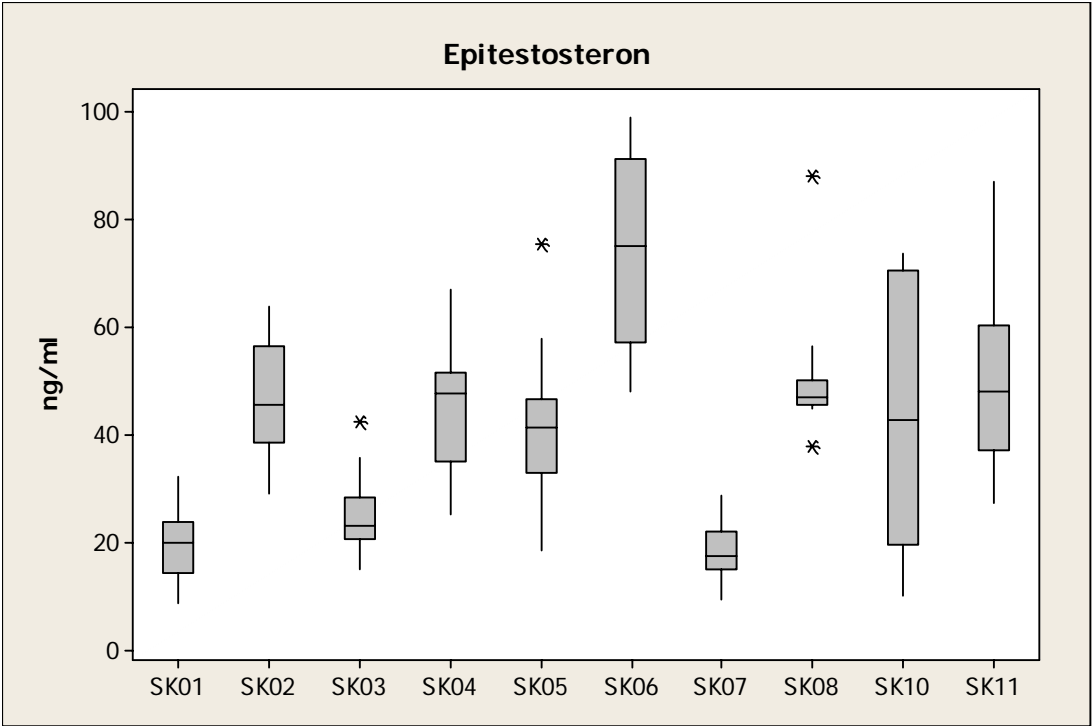
Figur 26 Resultatene for androsteron



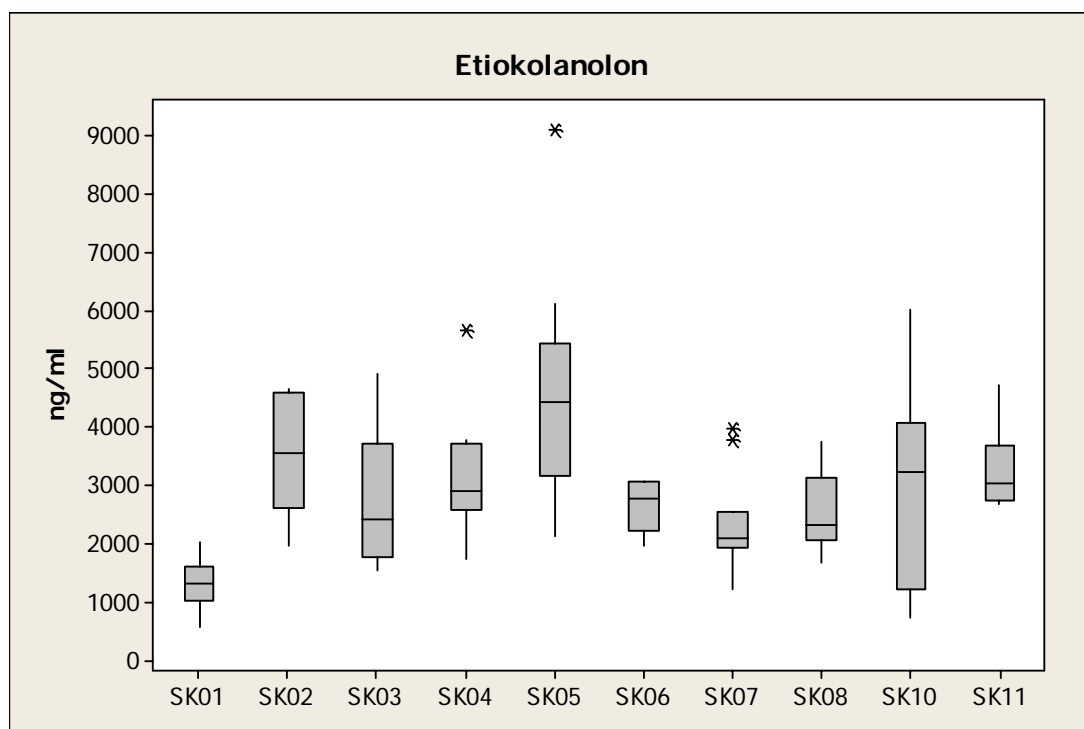
Figur 27 Resultatene for DHEA



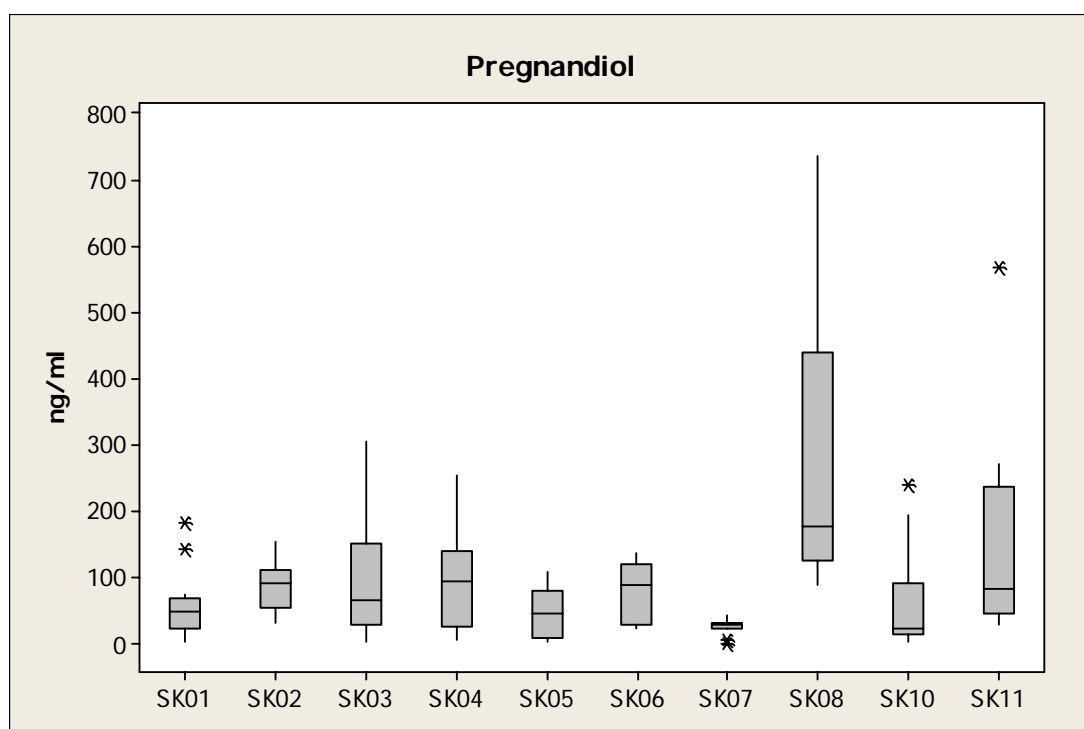
Figur 28 Resultatene for DHT



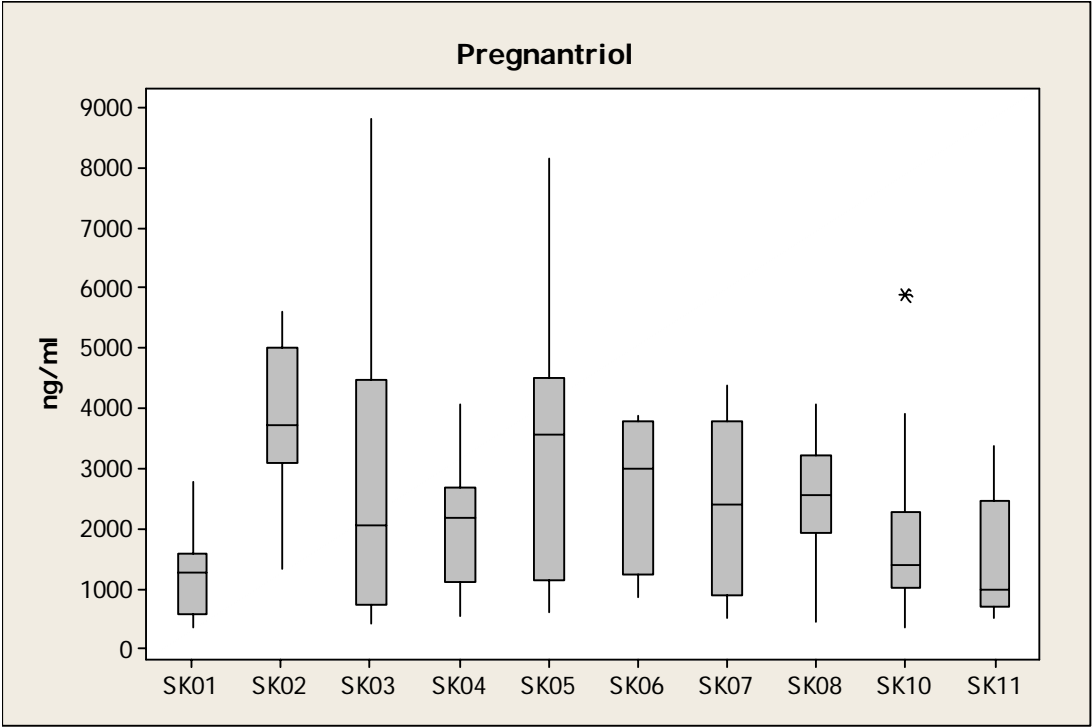
Figur 29 Resultatene for epitestosteron



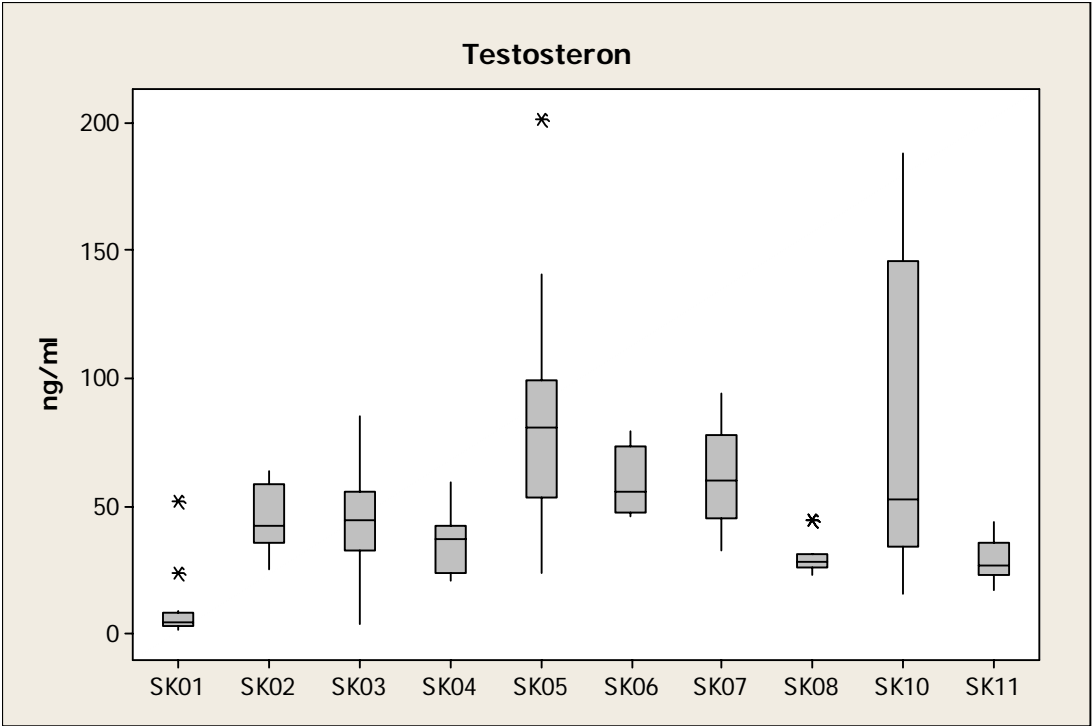
Figur 30 Resultatene for etiokolanolon



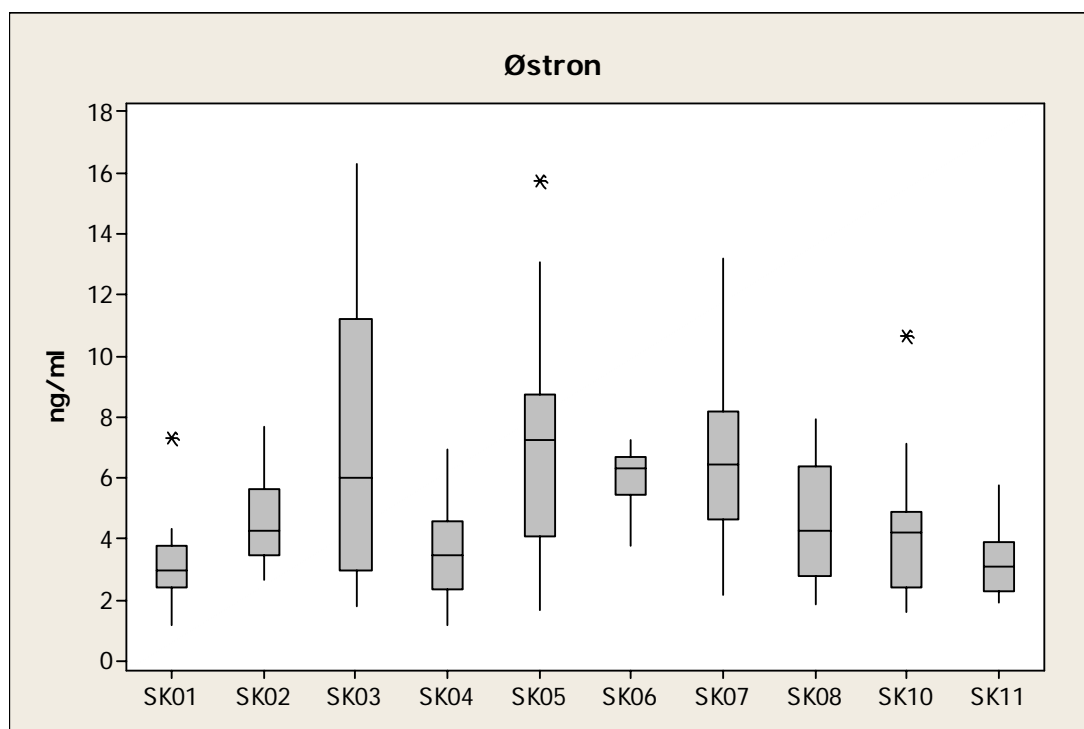
Figur 31 Resultatene for pregnandiol



Figur 32 Resultatene for pregnantriol



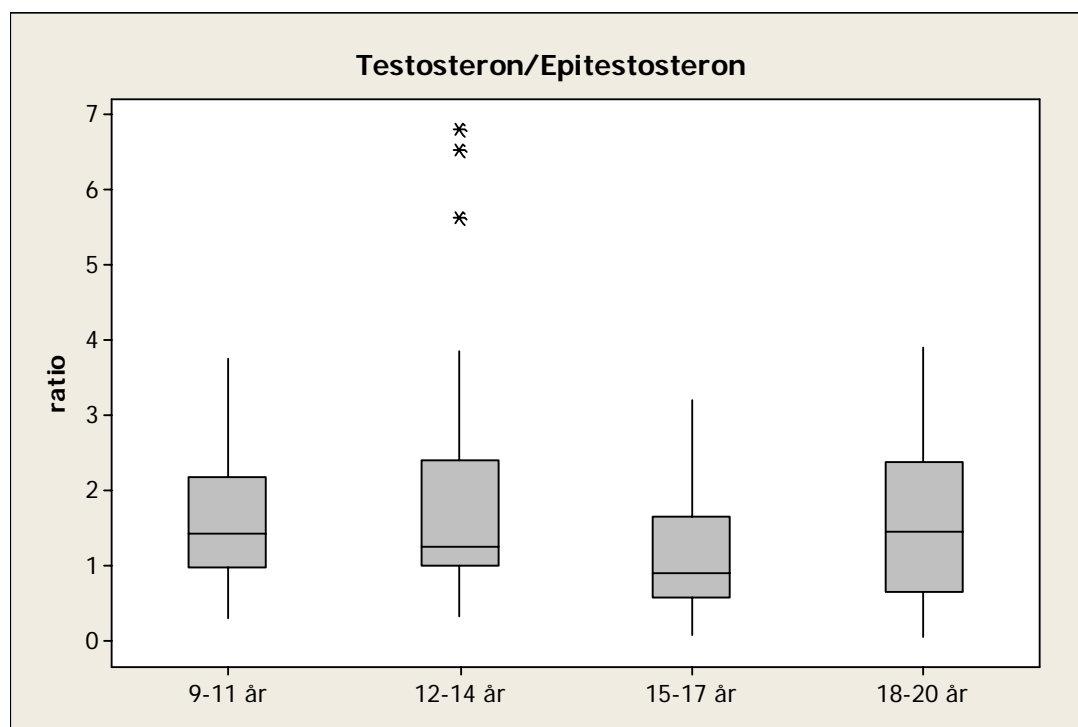
Figur 33 Resultatene for testosteron



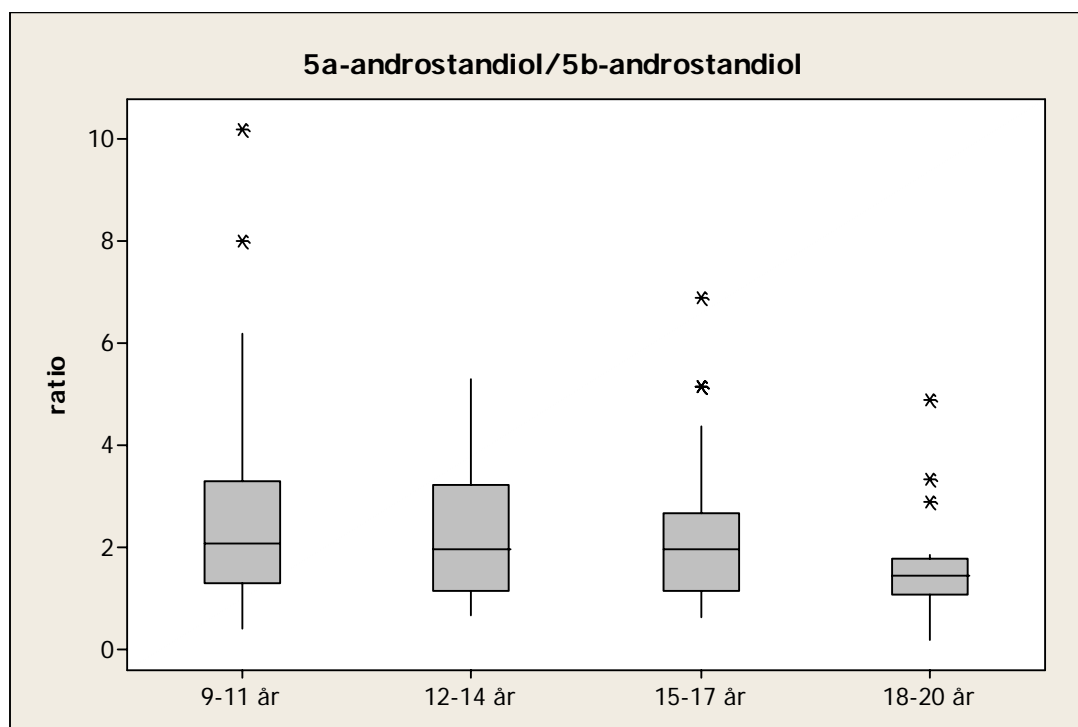
Figur 34 Resultatene for østron

### 3.5. Ratioer i prøvene fra Danmark

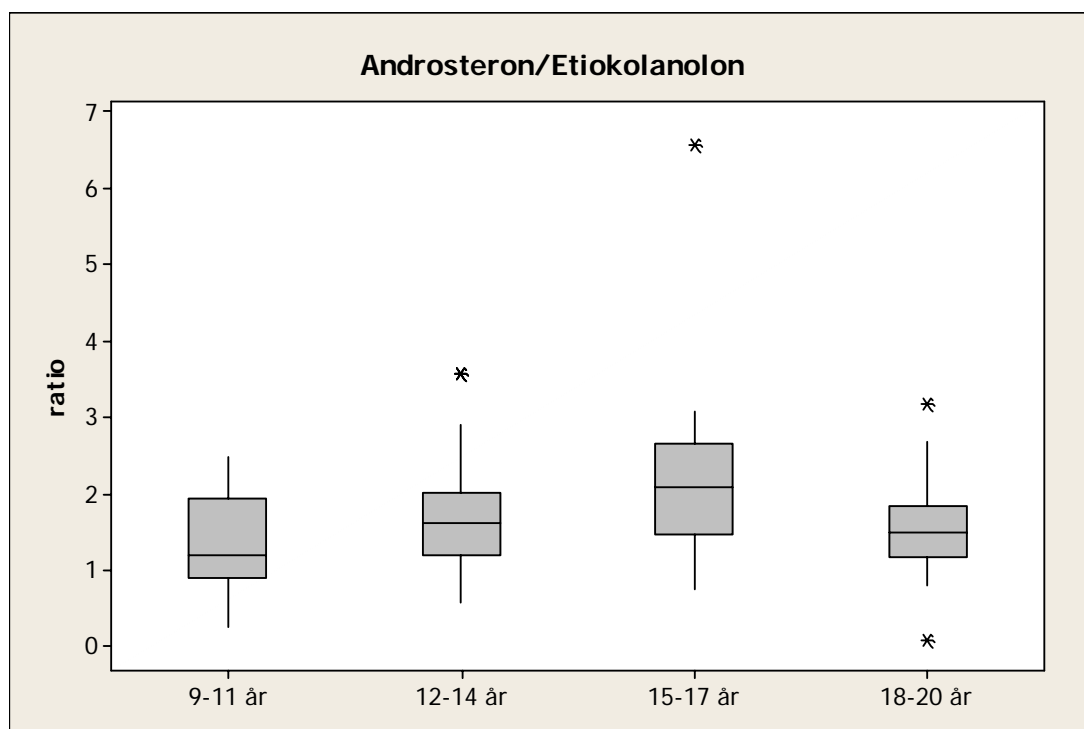
Figur 35-37 viser de aktuelle ratioene beregnet ut ifra resultatene til de danske prøvene.



Figur 35 T/E ratioen fra de danske prøvene



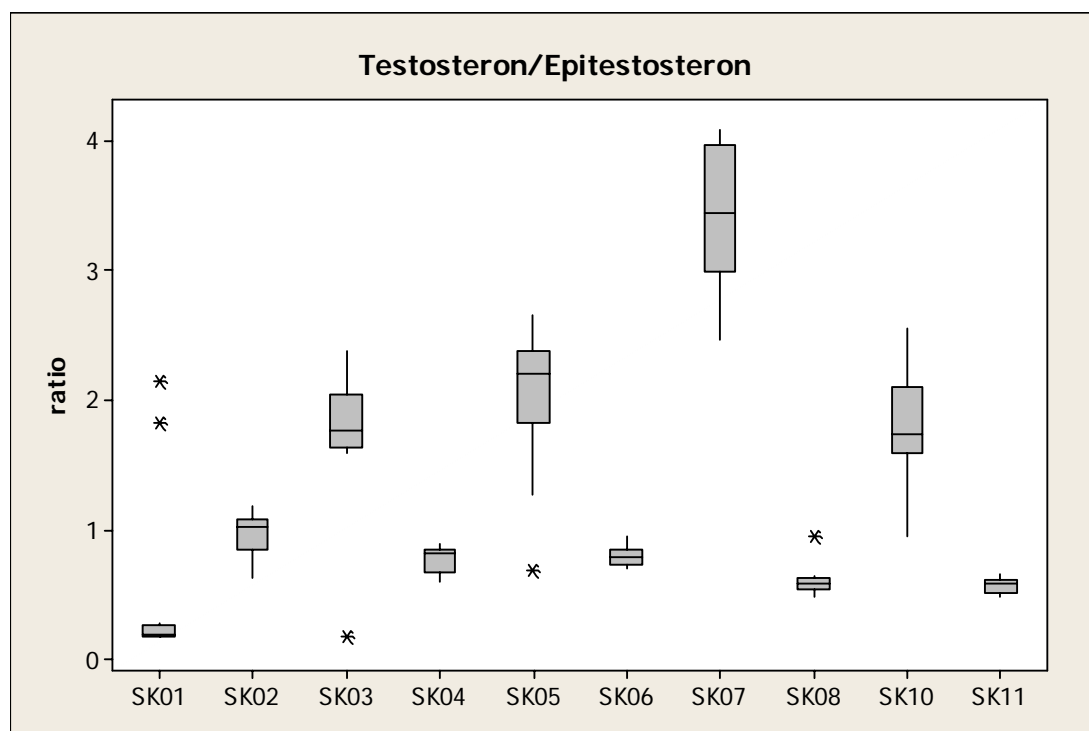
Figur 36 5a-androstandiol/5b-androstandiol ratioen fra de danske prøvene



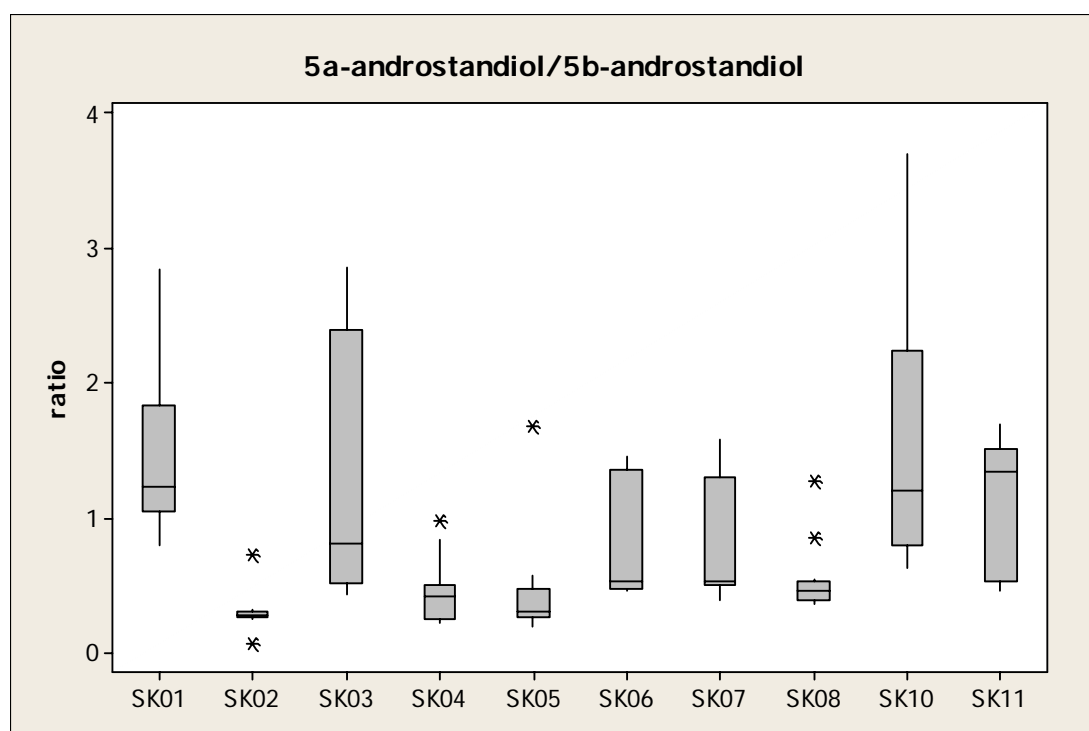
Figur 37 Androsteron/Etiokolanolon ratioen fra de danske prøvene

### 3.6. Ratioer i prøvene fra fodboldspillerne

Figur 38 til 40 viser de aktuelle ratioene beregnet ud ifra resultatene til fodboldspillerne.

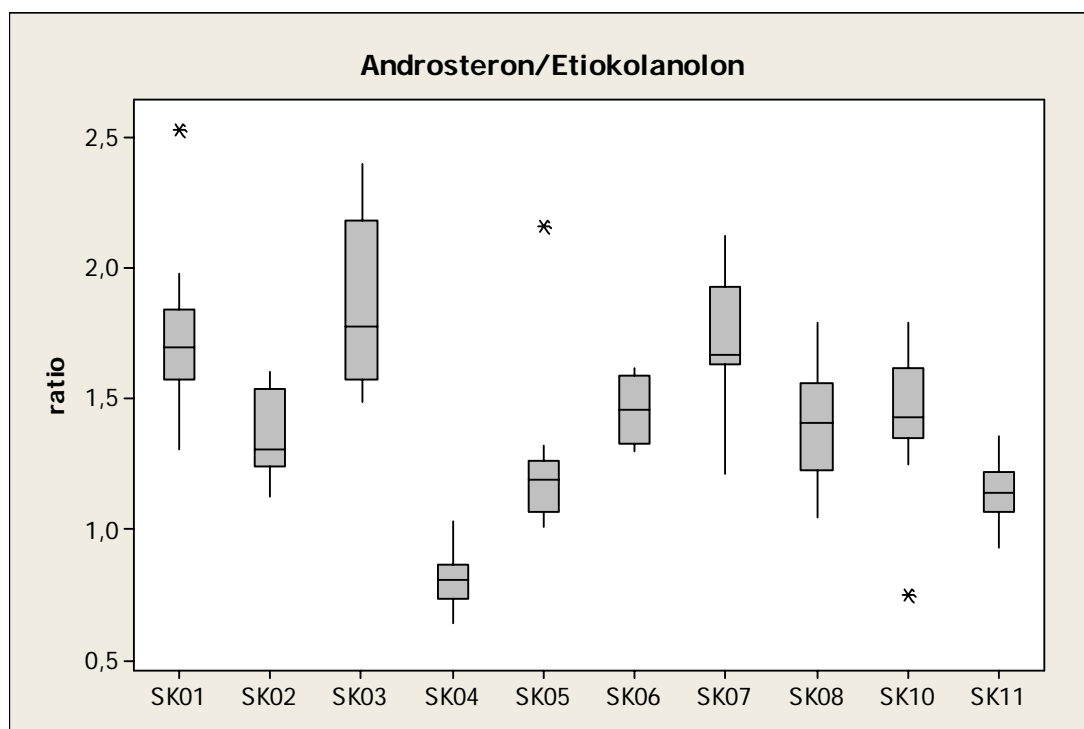


Figur 38 T/E ratioen for fodboldspillerne



Figur 39 5 $\alpha$ -androstandiol/5 $\beta$ -androstandiol ratioen til fodboldspillerne





Figur 40 Androsteron/etiokolanolon ratioen til fodboldspillerne.



## 4. Diskusjon

### 4.1. Valideringen

For at kravet til linearitet skal være innfridd bør standardkurver ha en korrelasjonskoeffisient som er større enn 0,985. Det er kun 4 av stoffene som oppfyller dette kravet. Dette skyldes av kurven ikke er lineær over hele konsentrasjonsområdet, men bøyer litt av ved de høyeste konsentrasjonene. Dette får den konsekvensen at kurven blir vippet litt opp i det laveste området, noe som fører til at kurven ikke går gjennom origo, selv om punktene i det laveste området vil gi en kurve som går gjennom origo. Det ble her valgt å tvinge kurven gjennom origo, siden dette vil gi en mest mulig riktig bestemmelse av konsentrasjonene.

For presisjon og nøyaktighet er det satt grenseverdier på henholdsvis 30 % og 25 %. De aller fleste stoffene ligger under disse verdiene. Resultatene viste, som forventet på forhånd, at verdiene til de stoffene som ikke har egen deuterert internstandard vil være høyere enn for de som har egen deuterert internstandard og det er akseptabelt at disse kan ligge litt over grenseverdiene. Det er normalt størst prosentvis avvik fra "sann" verdi i det laveste punktet, dette gjelder også i denne studien for intra-assay verdiene. For inter-assay verdiene ligger det midterste punktet høyest, og for noen av stoffene over grenseverdiene, uten at det er noen åpenbar grunn til dette. Dette bør, særlig for de stoffene som har egen deuterert internstandard og ligger over grenseverdien, undersøkes nærmere for å kunne utelukke at dette skyldes tilfeldige feil. Inter-assay verdiene ligger generelt litt høyere enn intra-assay verdiene. Dette kan forklares med at når en prøve opparbeides på forskjellige dager øker sannsynligheten for at tilfeldige feil skal oppstå.

Gjenvinningen til stoffene er veldig bra for androstanene og østron, men er noe lavere for pregnanene. Disse har en lengre sidekjede i C-17 og innehar dermed litt andre egenskaper i fordelingen mellom lipofilt og hydrofilt i prøveoppbeidelsen.

LOQ ligger for alle stoffene, bortsett fra 11 $\beta$ -hydroksyandrosteron, DHT og pregnantriol under det laveste punktet på kurvene. Dette vil si at det er mulig å

kvantifisere stoffene i hele kalibreringsområdet for de aller fleste stoffene ut i fra de kriterier som er satt for LOQ i denne valideringen. LOQ kan også bestemmes ut ifra signal/støy forholdet. LOQ er da gitt ved et signal/støyforhold på 10:1. Ut i fra dette kriteriet vil LOQ for 11 $\beta$ -hydroksyandrosteron, DHT og pregnantriol komme under minste verdi for kurven.

En generell tendens som viser seg i alle valideringsparameterne er at de stoffene som har en egen deuterert internstandard har mye bedre presisjon og nøyaktighet, i tillegg til at LOQ blir mindre. Dette viser hvor stor innvirkning en god internstandard har på resultatene.

## **4.2. Forsøket**

Den største, mulige feilkilden i denne type forsøk er hvorvidt forsøkspersonene følger de gitt retningslinjene, og i denne studien er usikkerheten størst hos gruppen med fotballspillere. I denne gruppen hadde hver enkelt ansvar for at urinprøven ble tatt etter de angitte instruksjonene, dvs. midtstrøms morgenurin og oppbevaring kaldt helt til prøvene ble hentet. Siden prøvene ble samlet inn på ettermiddagen, er det muligheter for at det ikke er den første urinen som har blitt samlet inn. Betydningen av hvilken dag urinen ble samlet inn på var liten, siden innsamlingen gikk over et såpass langt tidsintervall. Spillerne hadde derfor muligheten til å levere inn urinprøven dagen etter, for å høyne sjansene for at det faktisk var morgenurinen som ble samlet inn.

For de danske prøvene finnes det mer dokumentasjon for hvordan prøvene ble samlet. Der er det samlet hele morgenurinen, og tidspunktet for når prøven ble avgitt dokumentert. Disse prøvene ble fryst med en gang og oppbevart ved -20°C til de ble sendt til Norge. For disse prøvene er altså feilkildene noe mindre.

Mikrobiell degradering av prøven vil påvirke konsentrasjonene av steroidene. Dette kan unngås ved å oppbevare prøvene kjølig til de blir analysert. For å kontrollere at prøvene ikke har gjennomgått slik nedbrytning, ble androstandion vurdert kvalitativt for alle prøvene. Forhøyede verdier av androstandion er en indikasjon på nedbrytning. [33] Ingen av prøvene som ble analysert viste forhøyede androstandionverdier.

For å kunne få resultater som er mest mulig sammenliknbare ble alle målte verdier for stoffene korrigert for spesifikk vekt. Dette er ikke vanlig å gjøre i screeninganalyser i dopingsammenheng.

I denne studien er det bare sett på morgenuriner. Dopingprøver blir innkrevd til alle døgnets tider. I reelle dopingprøver vil resultatene variere mer, da det i denne sammenhengen må tas hensyn til den normale døgnvariasjonen av steroidene.

#### 4.2.1. Prøvene fra Danmark

Prøvene fra Danmark viser utviklingen i utskillelse av de valgte steroidene hos gutter fra 9 års alderen til 20 års alderen. Det er en klar tendens hos de fleste stoffene at konsentrasjonene øker fra den første gruppen og opp til 15-17 års gruppen. Deretter oppstår det en utflatning eller en svak nedgang til 18-20 års gruppen. Verdiene for disse to siste gruppene samsvarer også med verdiene for fotballspillerne.

De stoffene som ikke viser denne tendensen er  $6\beta$ -hydroksyandrosteron,  $6\beta$ -hydroksyetiokolanolon og pregnandiol. Dette kan skyldes at disse stoffene også dannes uavhengig av de andre stoffene, og at hovedproduksjonen ikke er testikulær, men foregår i binyrebarken, som gjør at den hormonelle modningen ikke spiller like mye inn på konsentrasjonene til disse stoffene.

Verdiene for DHT viser heller ikke denne tendensen. Grunner til at dette er diskutert under DHT i kapittel 4.2.3.

#### 4.2.2. Prøvene fra fotballspillerne

Prøvene fra fotballspillerne viser et normalområde for friske menn. Siden antall forsøkspersoner i denne studien bare er 10, vil dette kun gi en indikasjon for hvor normalområdet er for den friske mannlige befolkningen. Områdene blir store, da den interindividuelle variasjonen er stor. Den intraindividuelle variasjonen er mindre, selv om den også i noen tilfeller kan bli ganske stor.

Siden utskillelsen av steroider varierer med døgnet, vil også tidspunktet for prøvetakningen ha noe å si i prøver som blir tatt i dopingsammenheng. For å kunne utelukke denne variasjonen er det vanlig å se på forskjellige ratioer. I denne oppgaven legges det vekt på ratioene T/E, androsteron/etiokolanolon og  $5\alpha$ -androstadiol/ $5\beta$ -androstadiol, da disse er de ratioene som sier mest om mulig inntak av dopingmidler.

Resultatene av disse ratioene viser at disse varierer mye fra person til person, men variasjonen for hver enkeltperson er mye mindre enn for hvert enkelt stoff. Dette er som forventet, da ratioene ikke vil være påvirket av urinkonsentrasjon og sannsynligvis ikke av døgnvariasjon, dersom steroidene i ratioen følger samme døgnvariasjon.

### 4.2.3. Stoffene

#### 5 $\alpha$ -androstandiol og 5 $\beta$ -androstandiol

Figur 5 og figur 6 viser at 5 $\alpha$ -androstandiol og 5 $\beta$ -androstandiol har en klar tendens til å øke i konsentrasjon opp til 15 års alderen. 5 $\alpha$ -androstandiol stabiliserer den seg i området 50-400 ng/ml. Det er også dette området som de aller fleste prøvene fra fotballspillerne ligger i. Selv om her er kan det argumenteres for at området går litt høyere enn opp til 400 ng/ml. Fotballspillerne ligger innenfor området 50-550 ng/ml. Som vist i figur 5 og figur 21 kan enkeltverdier komme utenfor dette området, uten at det tilsier bruk av doping. Også for 5 $\beta$ -androstandiol stabiliseres verdiene i 15 års alderen, og ligger da i området fra 50 ng/ml til 300 ng/ml. Her er det også enkeltverdier som indikerer at dersom det hadde vært inkludert flere prøver i studien, kunne maksimalverdiene ha ligget litt høyere. Fotballspillerne ligger igjen litt høyere enn prøvene fra Danmark, innenfor området 50-700 ng/ml.

#### 6 $\beta$ -Hydroksyandrosteron og 6 $\beta$ -hydroksyetiokolanolon

Disse to stoffene viser ikke den tendensen andre stoffer har til å øke med hormonell modning. Dette kan tyde på at det ikke er dette som styrer konsentrasjonen av disse to stoffene, og at de blir dannet uavhengig av konsentrasjonen av det som man antar er modersubstansene, androsteron og etiokolanolon. Dette underbygges også av at variasjonene mellom fotballspillerne er mye mindre for disse to stoffene enn de er for de andre stoffene.

Mulige forklaringer for disse observasjonene kan være:

- de har også et annet opphav enn den metabolismeveien som er beskrevet i denne oppgaven, som påvirker konsentrasjonen av stoffene i mye større grad.
- 6 $\beta$ -hydroksylase som er det enzymet som omdanner androsteron og etiokolanolon til 6 $\beta$ -hydroksymetabolittene har metningskinetikk og virker upåvirket av konsentrasjonene til androsteron og etiokolanolon når konsentrasjon er stor nok. Dersom det er mye av androsteron og etiokolanolon skyves heller metabolismen over til andre veier, istedenfor at hydroksylasen omdanner mer.
- produksjonen i binyrebarken er mer fremtredene enn den fra testiklene. Produksjonen i binyrebarken er mindre avhengig av den hormonelle utviklingen, enn produksjonen i testiklene.

**11 $\beta$ -Hydroksyandrosteron og 11 $\beta$ -hydroksyetiokolanon**

Disse stoffene viser også tendensen til å øke med alder. For 11 $\beta$ -hydroksyandrosteron er det ikke noen markant utflatning i de siste aldersgruppene. Her fortsetter konsentrasjonen å øke opp til 18-20 års gruppen. Området som denne gruppen ligger i er fra 100-1500 ng/ml. For gruppen med fotballspillere ligger verdiene i den øverste delen av dette området og mange har verdier som går over 1500 ng/ml. Dette kan indikere at verdiene for dette stoffet fortsetter å øke ut over 20 års alderen, da mange av fotballspillerne er eldre enn dette. Normalområdet for fotballspillerne var i området fra 200 ng/ml til 3000 ng/ml.

11 $\beta$ -Hydroksyetiokolanon har en klar nedgang i gruppen 18-20 år i forhold til 15-17 år. 15-17 års gruppen ligger i området 10-900 ng/ml, mens for gruppen 18-20 år er høyeste verdi rundt 800 ng/ml. Fotballspillerne legger seg i området mellom 10-2000 ng/ml. Dette er et stort område, noe som gjør at området vanskelig kan brukes til noe. Den intraindividuelle variasjonen er for alle fotballspillerne, bortsett fra en, mindre og strekker seg over et område på ca. 800 ng/ml. Det kan derfor være spesielt nyttig for dette stoffet å se på det intraindividuelle området istedenfor det interindividuelle området.

11 $\beta$ -Hydroksyandrosteron og 11 $\beta$ -hydroksyetiokolanon kan også bli dannet fra kortisol. [11] Økte verdier av disse stoffene kan derfor også skyldes økt produksjon av kortisol i binyrene. Disse stoffene er med i steroidprofilen for å ha markører på at utskillelsen av steroidene er normal.

**Androsteron**

Her har WADA satt en grense for hva som er naturlig på 10 000 ng/ml. Ut i fra figur 11 og figur 26 fremkommer det at de aller fleste ligger godt under denne verdien, men enkeltverdier kan også her ligge over denne grensen. Ut i fra figurene kan det se ut som at det er veldig få verdier som ligger over 8000 ng/ml, men tidligere erfaringer med dopingarbeid tilsier at det er en større andel som ligger over grensen på 10 000 ng/ml, enn det denne studien skulle tilsi.

**DHEA**

For DHEA har WADA satt en grenseverdi på 100 ng/ml. Hvis man tar tallgrunnlaget fra fotballspillerne og de to eldste gruppene fra Danmark, der til sammen 9 av totalt 160 prøver lå over 100 ng/ml, ser det ut som om dette tallet er noe lavt. En grenseverdi rundt 200 ng/ml er nok et bedre mål, selv om 3 prøver lå over denne verdien også.

### DHT

Dette stoffet viser ikke tendensen til å øke i konsentrasjon med alder. Der ligger nivåene ganske jevnt frem til den siste gruppen, hvor det kan sees en liten nedgang. Verdier for fotballspillerne varierer mye og gir heller ingen klar tendens. Dette kan skyldes at enzymet som omdanner testosteron til DHT har metningskinetikk, eller at urinkonsentrasjonene ikke samsvarer med serumkonsentrasjonene av DHT.

### Epitestosteron

WADA har satt en øvre grense på epitestosteron til 200 ng/ml. Dette kan være en fornuftig grense, da man ser ut i fra figur 14 og figur 29 at de aller fleste ligger godt under dette. Men enkeltverdier i gruppe 15-17 år i figur 14 viser at det er mulig å ha naturlig forhøyede verdier ut over 200 ng/ml uten at det er inntatt doping.

### Etiokolanolon

For etiokolanolon har WADA satt en grenseverdi på 10 000 ng/ml. Dette kan være en fornuftig grense, da høyeste verdi målt, både for de danske prøven og for fotballspillerne, ligger rundt 9000 ng/ml. Normalområdet for voksne menn, målt i denne studien, ligger mellom 500 og 6000 ng/ml.

### Pregnandiol

Pregnandiol viser ikke tendensen til å øke med økende alder. Dette kan bety at pregnandiol hovedsakelig blir dannet i en annen metabolisme vei enn den som er beskrevet her. Dersom den kommer fra en annen metabolismevei kan den bli brukt i en ratio, f. eks testosteron/pregnandiol, på samme måte som T/E-ratioen blir brukt i dag. Pregnandiol ligger litt over testosteronverdiene, og en normalratio mellom disse to stoffene ville ligget rundt 0,1-0,8.

### Pregnantriol

Pregnantriol er en markør for 17 $\alpha$ -hydroksyprogesteron konsentrasjonen i kroppen. Dette stoffet viser en tendens til å øke med alder, og fra 15 års alderen ligger området på 200-3000 mg/ml. Fotballspillerne fordeler seg i dette området, men en god del av disse har også verdier som går over dette. Fotballspillerne legger seg i området 500-8000 ng/ml.

### Testosteron

WADA har satt en øvre grense for testosteron på 200 ng/ml. Dette er en grense som ingen av de målte verdiene i denne studien kommer over. De aller fleste verdier ligger under 100 ng/ml, men 200 ng/ml er en fornuftig grense, da tallmaterialet viser at det ikke er unormalt å ha verdier som ligger over 100 ng/ml.



## Østron

Østron følger tendensen til å øke med alder opp til 15-17 års gruppen. Normalverdiene målt hos fotballspillerne ligger i området 0,5-16 ng/ml. Østron er en metabolitt av testosteron og viser for fotballspillerne en korrelasjon med testosteronverdiene.

### 4.2.4. Ratioer

Ratioene viser ikke den samme tendensen til å øke med alder, som de fleste stoffene gjorde. Dette indikerer at disse ratioene som det her er blitt sett på er aldersuavhengig.

## T/E

T/E ratioen viser forholdet mellom testosteron og epitestosteron. Viktigheten av denne ratioen i dopingsammenheng er forklart i kapittel 1.2. Det er vist av normalfordelingen av denne ratioen i en populasjon vil ha to klare fordelinger. Den ene gruppen har verdier mellom 0,07 og 0,25, mens den andre gruppen ligger i området 0,5 til 3,5. [10]

Figur 35 viser at denne ratioen har en stor interindividuell variasjon, mens den intraindividuelle variasjonen er mindre. WADA har satt en grenseverdi på 4 for denne ratioen, mens som vist for SK07 i figur 38 og gruppe 12-14 i figur 35 er det mulig å naturlig ha verdier opp mot og over denne grensen. Det er også vist i andre sammenhenger at verdien på denne ratioen kan ligge godt over 4, uten at det er brukt doping. Er verdien over 4, vil det i alle tilfeller ble gjort en bekreftelsesanalyse av testosteron eller metabolitter av testosteron med IRMS.

## 5α-androstandiol/5β-androstandiol

Denne ratioen blir brukt til å oppdage bruk av DHT. DHT er en 5α-forbindelse, som blir metabolisert til 5α-androstandiol. Testosteron blir omdannet til DHT av enzymet 5α-reduktase. Testosteron blir også direkte omdannet til 5β-androstandiol av 5β-reduktase. Ved bruk av DHT vil derfor konsentrasjonen av 5α-androstandiol bli betydelig høyere enn 5β-androstandiol konsentrasjonen, noe som fører til en forhøyet verdi av ratioen. Normalt ligger denne verdien under 3, mens som vist for de danske prøvene, kan denne ratioen for enkeltpersoner ligge høyere enn dette.

Figur 39 viser at det både er stor variasjon både intra- og interindividuell, selv om den intraindividuelle variasjonen er noe mindre enn den interindividuelle variasjonen.

**Androsteron/etiokolanolon**

Androsteron/etiokolanolon ratioen vil kunne en indikasjon på bruk av testosteron, androstendion og DHEA. Normalverdiene for denne ratioen er fra 0,5 til 3. Som vist på figur 40 ligger alle fotballspillerne i dette området. Men figur 37 viser at enkeltverdier kan komme over dette. Det er vist at ved administrering av testosteron og androstendion vil ratioen øke til over 3, mens ved bruk av DHEA vil ratioen bli lavere enn normalt.

Også denne ratioen er den interindividuelle variasjonen betydelig større enn den intraindividuelle.

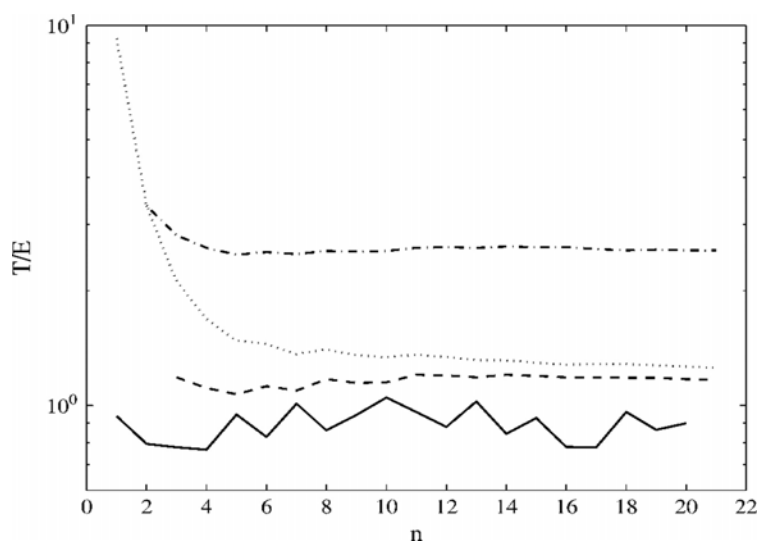
**4.2.5. Nye statistiske metoder**

Etter hvert som det blir lagt mer vekt på T/E ratioen i dopingsammenheng, er det uttrykt et ønske om å definere individuelle grenser på T/E verdien. Dette ønske kommer på bakgrunn av den store interindividuelle forskjellen.

Det er utviklet statistiske modeller for å detektere unormale variasjoner i longitudinale studier av biomarkører. Det ble først utviklet metoder som skulle brukes i forbindelse med bloddoping, men det har også blitt utviklet en metode for T/E ratioen. Målet med disse modellene er å ta dopingarbeidet fra det å jobbe med populasjonsbestemte "absolutte" grenseverdier for når en prøve er positiv eller negativ, til det å jobbe med individuelle grenser.

Ideen til disse modellene er å bruke den kunnskapen som finnes om den interindividuelle variasjonen av biomarkører og gradvis tilpasse modellen til den intraindividuelle variasjonen. Dette gjøres ved at hver nye individuelle måling blir sammenliknet med en grenseverdi. For den første målingen er denne grenseverdien satt ut ifra den interindividuelle variasjonen i populasjonen. Etter hvert som det blir flere målinger for en person vil denne grenseverdien tilpasse seg målingene og når antall prøver er stort nok, vil denne grenseverdien angi denne personens normalverdier.

Figur 41 viser hvordan en slik modell ut. Her er en serie med 20 T/E verdier, målt hos en person over en periode. Disse verdiene er vist med en heltrukket linje (—). Linjen som er markert med streker og prikker (-·-·-) viser den grenseverdien metoden regner ut for populasjonen, mens den prikkete linjen (····) viser den personlige grenseverdien. Linjen markert med streker (---) viser Z-verdien, ved en spesifisitet på 0,999. Dette vil si at modellen tar utgangspunkt i at de målingene av T/E ratioen som er gjort er normalfordelte. Linjen viser den verdien som 99,9 % av alle disse verdier i så tilfelle vil ligge under. [34]



Figur 41 Modell for bestemmelse av individuelle grenseverdier. [34]

En av hovedfordelene med disse metodene er at risikoen for falske positive ikke varierer med antall tidligere målinger. Men på grunn av antagelser som er gjort i oppbygningen av metoden, kan det ikke utelukkes falske positive svar. [34, 35]



## 5. Konklusjon

Det ble etablert og validert en metode for å kvantifisere endogene steroider i urin. Denne metoden ble brukt for å bestemme normalområder for disse steroidene og noen utvalgte ratioer i en gruppe barn/ungdom i alderen 9-20 år og i en gruppe fotballspillere.

Valideringen av metoden viser en klart bedre nøyaktighet og presisjon for de stoffene som hadde sin egen deutererte internstandard. Det er derfor ønskelig at alle stoffene som er inkludert i steroidprofilen har sin egen deutererte standard.

Resultatene viser at interindividuelle forskjellene er større enn de intraindividuelle forskjellene. Dette gir grunnlag for å si at individuell steroidprofilering, med longitudinell innsamling av data, er en god måte å finne normalverdier for enkelt utøvere, og dermed blir det også lettere å kunne avsløre bruk av endogene steroider i dopingsammenheng.

Resultatene viser også at de grenseverdiene som WADA har satt ikke alltid stemmer med de normalverdiene som finnes i de gruppene som er undersøkt her. Dette gjelder spesielt for DHEA, der grensen er satt litt for lavt. Ved bruk av individuell steroidprofilering av idrettsutøvere vil disse grenseverdiene være uinteressante, da disse grensene vil bli satt ulikt for hver enkelt utøver.

Det er tidligere blitt utviklet en statistisk metode som kan bli brukt for å bestemme individuelle grenseverdier for T/E ratioen. Denne metoden er ennå ikke tatt i bruk, men vil være et godt hjelpemiddel for å detektere bruk av testosteron.

Denne studien har bare tatt for seg gutter og menn, og kan derfor ikke si noe om normalverdiene for jenter og kvinner, da produksjonen av steroider er ulik hos kvinner og menn.



## Referanser

1. Haug, E., P. Hemmersbach, and K. Birkeland, *Glimt fra idrettens dopinghistorie*. Tidsskrift for Norsk Lægeforening, 1999. **17**(199): p. 2538-2540.
2. Haug, E., K.I. Birkeland, and P. Hemmersbach, *Doping og idrettsutøvere*, in *Medicinsk årbog 2000*. 2000, Munksgaard: København. p. 9-18.
3. Noakes, T.D., *Tainted Glory -- Doping and Athletic Performance*. 2004. p. 847-849.
4. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org). *A brief history of anti-doping*. [cited 09.10.2007].
5. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org). *The 2007 Prohibited list Internatoinal standard*. 2006 [cited 09.04.2007].
6. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 28*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
7. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org). *World Anti-Doping Code*. 2003 [cited 23.09.2007].
8. Donike, M., *Steroid profiling in Cologne*, in *10th Cologne Workshop on dope analysis, 7th to 12th june 1992 - proceedings-*, M. Donike, et al., Editors. 1992, SPORT und BUCH strauss: Kølñ.
9. Kerkhof, D.v.d., *Part 1: Steroid profiling and the T/E ratio*, in *Steroid profiling in doping analysis*. 2001, Febodruk BV.
10. Ayotte, C., D. Goudreault, and A. Charlebois, *Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996. **687**(1): p. 3-25.
11. Demers, L.M. and R.J. Whitley, *Function of the adrenal cortex*, in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, C.A. Burtis and E.R. Ashwood, Editors. 1999, W.B. Saunders company: Philadelphia.
12. Gronowski, A.m. and M. Landau-Levine, *Reproductive endocrine function*, in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, C.A. Burtis and E.R. Ashwood, Editors. 1999, W.B. Saunders company: Philadelphia.
13. Saudan, C., et al., *Testosterone and doping control*. 2006. p. i21-24.
14. Llewellyn, W., *Andractim (dihydrotestosterone)*, in *Anabolics 2005*. 2005, Body of Science.
15. Shackleton, C.H.L., et al., *Androstanediol and 5-androstanediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: Potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry*. Steroids, 1997. **62**(10): p. 665-673.
16. Van Eenoo, P. and F.T. Delbeke, *Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control--New steroids and new insights*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2006. **101**(4-5): p. 161-178.
17. Kicman, A.T. and D. Gower, *Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives* Annals of Clinical Biochemistry, 2003. **40**(4): p. 321-356.
18. Homma, K., et al., *Elevated Urine Pregnanetriolone Definitively Establishes the Diagnosis of Classical 21-Hydroxylase Deficiency in Term and Preterm Neonates*. 2004. p. 6087-6091.

19. Schänzer, W., *Metabolism of anabolic androgenic steroids*. 1996. p. 1001-1020.
20. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 21*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
21. Greibrokk, T., E. Lundanes, and K.E. Rasmussen, *Kapittel 16*, in *Kromatografi*. 1998, Univerisitetsforlaget: Oslo.
22. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 18*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
23. Nordli, H.R., *Bestemmelse av endogene steroider i urin*. 1994, Hormonlaboratoriet: Oslo.
24. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 23*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
25. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 22*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
26. Greibrokk, T., E. Lundanes, and K.E. Rasmussen, *Kapittel 8 Gasskkromatografi*, in *Kromatografi*. 1998, Univerisitetsforlaget: Oslo.
27. Trout, G.J. and R. Kazlauskas, *Sports drug testing - an analyst's perspective*. Chemical Society Reviews, 2003.
28. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 17*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
29. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 20*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
30. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org). WADA Technical document - TD2003IDCR - *Identification criteria for qualitative assays incorporating chromatography and mass spectrometry*. 2003 [cited 24.09.2007].
31. Weykamp, C.W., *Steroid Profile for Urine: Reference Values*. Clinical Chemistry, 1989. **35**(12): p. 2281-2284.
32. Burtis, C.A. and E.R. Ashwood, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Vol. 3. 1999, Philadelphia: W. B. Saunders Company.
33. [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org). WADA Technical Document - TD2004EAAS, *Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids*. 2004 [cited 04.10.2007].
34. Sottas, P.-E., et al., *Bayesian detection of abnormal values in longitudinal biomarkers with an application to T/E ratio*. 2007. p. 285-296.
35. Sottas, P.-E., et al., *Statistical Classification of Abnormal Blood Profiles in Athletes*. The International Journal of Biostatistics, 2006. **2**(1).